

UNIVERZITA KARLOVA  
**3 . L É K A Ř S K Á F A K U L T A**



**Disertační práce**

**MOŽNÉ PERSPEKTIVNÍ VYUŽITÍ GHRELINOVÝCH  
MECHANISMŮ V TERAPII ZÁVISLOSTÍ NA  
OPIOIDECH**

POSSIBLE PERSPECTIVE USE OF GHRELIN MECHANISMS IN  
THE TREATMENT OF OPIOID ADDICTION

**PRAHA, 2019**

**PHARMDR. PAVEL JEŘÁBEK**

**ŠKOLITELKA: PharmDr. Magdaléna Šustková, CSc.**

**PRACOVISTĚ: Ústav Farmakologie 3. LF UK**

**STUDIJNÍ PROGRAM: Farmakologie a toxikologie**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací. Prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze práce a verze elektronická nahraná do Studijního informačního systému (SIS 3.LF UK) jsou totožné.

V Praze, 3. 3. 2019

PAVEL JEŘÁBEK

## **Identifikační záznam:**

JEŘÁBEK, Pavel. *Možné perspektivní využití ghrelinových mechanismů v terapii závislosti na opioidech. [Possible perspective use of ghreline mechanisms in the treatment of opioid addiction]*. Praha, 2019. 113 stran, 3 přílohy. Disertační práce Ph.D. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav farmakologie. Vedoucí práce: PharmDr. Magdaléna Šustková, CSc.

## **Poděkování:**

Především bych chtěl poděkovat své školitelce paní PharmDr. Magdaléně Šustkové, CSc., za její čas strávený vedením mé práce, laskavou pomoc a odborné rady v průběhu celého mého studia. Dále bych pak rád poděkoval všem svým kolegům, se kterými jsem se v průběhu studia setkal a kteří mi více či méně pomáhali a se kterými jsem sdílel společnou cestu za vědeckým poznáním. Neméně pak laboratorním asistentkám Evě, Blance a Markétě, které nám s experimenty pomáhaly a staraly se o zvěřinec.

Díky patří též mé manželce Lence a mým rodičům, za podporu a umožnění mého studia.

## Souhrn:

Předkládaná disertační práce se věnuje úzké problematice nového perspektivního výzkumného směru, kterým je studium možnosti využití ghrelinových mechanismů v léčbě závislostí na opioidech. Shrnuje nejzákladnější obecné principy neurobiologických mechanismů závislosti na návykových látkách a základní léčebné směry a postupy, které z těchto poznatků vycházejí. V práci je uváděna jedna z nejužívanějších definic závislosti jako onemocnění spolu s faktory, které k jejímu vzniku a průběhu přispívají. V hlavních rysech jsou zde popsány jednotlivé opakující se fáze (cykly) závislosti na návykových látkách spolu s popisem předpokládané účasti jednotlivých mozkových struktur a základních neuromediátorů, které se těchto fází účastní, včetně odkazů na nejdůležitější literární poznatky o úloze ghreluinu v mechanismech závislosti, podrobněji zaměřených na mechanismy působení ghreluinu v závislosti na opioidech. Ve vlastní experimentální části jsou uvedeny výsledky experimentů CNS mikrodialýzy nukleus accumbens u potkanů s premedikací antagonistou ghrelinového receptoru GHS-R1A, látkou JMV2959, a to jak v akutním experimentu s jednorázovým podáním dávek morfinu, tak i v experimentu sub-chronickém, ve kterém byl morfin podáván pokusným zvířatům ve zvyšujících se dávkách po dobu pěti po sobě jdoucích dnů. Efekt antagonisty GHS-R1A jsme v sub-chronickém pokuse sledovali v premedikaci před tzv. provokační dávkou morfinu, aplikovanou po deseti- až dvanácti-denní abstinenci. Výsledky jsou uvedeny ve vztahu ke změnám hladiny dopaminu, hlavního neuromediátoru, účastnícího se závislostních procesů, kde podání antagonisty ghreluinu významně snížilo akumbální hladiny dopaminu v akutním i sub-chronickém experimentu. U metabolitu dopaminu, 3-metoxytyraminu (3-MT), pak způsobilo významné zeslabení zvýšení jeho koncentrace vyvolané nižší dávkou morfinu (5 mg / kg, s.c.). U 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny (DOPAC), pak při podání vyšší dávky morfinu (10 mg / kg, s.c.) premedikace ghrelinovým antagonistou významně zesílila zvýšení její hladiny a podobný efekt byl pozorován rovněž u kyseliny homovanilové (HVA), vše v průběhu akutního

experimentu. Obdobně tomu bylo u dopaminových metabolitů i při experimentech s chronickou aplikací morfinu. Dále pak se práce zabývá vlivem centrálních ghrelinových mechanismů na endokannabinoidní systém v nukleus accumbens. Zjistili jsme, že podání GHS-R1A antagonisty zvrátilo morfinem vyvolané zvýšení hladiny anandamidu (AEA) a způsobilo statisticky významné snížení v akutním i sub-chronickém experimentu. U 2-arachidonylglycerolu (2-AG), podání ghrelinového antagonisty statisticky významně prohloubilo morfinem vyvolaný pokles jeho hladiny a to jak v akutním, tak i sub-chronickém experimentu. V neposlední řadě je pak popsán vliv výše zmíněného podání antagonisty ghrelinového receptoru na změny chování pokusných zvířat v rámci kategorií – imobilita, lokomoce, katalepsie a stereotypie, v průběhu mikrodialyzačních experimentů. Premedikace JMV2959 významně snížila morfinem indukovanou behaviorální stimulaci i výskyt stereotypií v akutním experimentu a významně ztlumila projevy provokační dávkou morfinu vyvolané behaviorální senzitivace v sub-chronickém experimentu. Dále jsme zjistili, že premedikace JMV2959 významně snížila morfinem navozenou / podmíněnou preferenci místa (CPP) u potkanů. Metodou pozorování pohybu zvířat v otevřené aréně (open field) jsme prokázali, že samotný JMV2959 v dávkách 1, 3 a 6 mg/kg ve sledovaném období významně neovlivnil spontánní explorační aktivitu potkanů. Naše výsledky tak podporují další výzkum možností využití ghrelinového antagonizmu v terapii opioidních závislostí.

**Klíčová slova:**

Opioidní závislost, orexigenní hormony, morfin, ghrelinový receptor, nukleus accumbens, *in vivo* mikrodialýza, podmíněná preference místa, explorační spontánní aktivita, změny chování

## **Summary:**

This dissertation deals with the narrow issue of the new perspective research direction, which is research of the possibility of using ghrelin mechanisms in the treatment of opioid addiction. The thesis summarizes the most basic general principles of neurobiological mechanisms of drug addiction and the basic treatment guidelines and procedures based on these findings. One of the most widely used definitions of addiction as a disease, together with the factors contributing to its formation and course, is presented in this dissertation. The main features describe individual repetitive phases (cycles) of addictive substance addictions, along with a description of the expected involvement of individual brain structures and basic neuromediators involved in these phases, including references to the most important literary findings on the role of ghrelin in addiction mechanisms, focused on mechanism of action of ghrelin in the opioid addiction. In the experimental part, the results of the CNS microdialysis experiments in rats with GH-R1A antagonist, JMV2959 pretreatment, were presented in both the acute single dose morphine experiment and the chronic experiment in which morphine was administered to experimental animals in increasing doses for five consecutive days. The results are presented in relation to changes in the level of dopamine, the major neuromediator involved in addiction processes, where antagonist administration significantly reduced dopamine levels in the acute and chronic experiment. In its metabolite, 3-methoxythymine (3-MT) levels, then caused a significant weakening in its concentration increase after the administration of a lower dose of morphine (5 mg / kg, s.c.). In 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), a higher dose of morphine (10 mg / kg, s.c.) significantly increased its elevation and a similar effect was also observed for homovanilic acid (HVA), all during acute experiments. Similar effect was also observed in dopamine metabolites during the experiments with chronic morphine application. Furthermore, the dissertation deals with the influence of the endocannabinoid system and changes in anandamide (AEA) levels, where the antagonist administration reversed the morphine-induced increase

and, on the contrary, caused a statistically significant reduction in its concentration levels in the acute and chronic experiment. For 2-arachidonylglycerol (2-AG), the administration of the antagonist significantly deepened its decrease in both the acute and chronic experiment. The effect of the above mentioned administration of the ghrelin receptor antagonist on behavioral changes of the experimental animals within the categories - immobility, locomotion, catalepsy and stereotypes, was observed, where JMV2959 premedication significantly reduced morphine-induced behavioral sensitization in both, acute and chronic experiment. Furthermore, we confirmed, that pretreatment with JMV2959 significantly reduced the morphine-induced conditioned place preference (CPP) in rats. We observed, that 1, 3 and 6 mg/kg doses of JMV2959 did not significantly influence the rat spontaneous explorative activity in the „open-field“ arena. Finally our presented results support further research of the possibilities of using ghrelin antagonism in the treatment of opioid addiction.

**Keywords:**

Opioid addiction, orexigenic hormones, morphine, ghrelin receptor, nucleus accumbens, in vivo microdialysis, conditioned place preference, spontaneous explorative activity, behavioral changes



# Obsah

1.	Literární úvod a přehled problematiky .....	14
1.1	Aktuální stav problematiky závislosti na návykových látkách .....	14
1.2	Význam hormonů regulujících příjem potravy .....	15
1.3	Základní mechanismy závislosti na návykových látkách.....	15
1.3.1	Definice závislosti a faktory vzniku závislosti.....	15
1.3.2	Fáze závislosti na návykových látkách .....	18
1.4	Neurobiologické mechanismy opioidní závislosti .....	24
1.5	Základní současné léčebné přístupy u opioidní závislosti.....	25
1.6	Využití animálních modelů a moderních technik.....	27
1.6.1	Využití metody CNS mikrodialýzy u hlodavců .....	28
1.6.2	Monitorování spontánní aktivity (Open field).....	30
1.6.3	Podmíněná preference místa (conditioned place preference, CPP).....	31
1.6.4	Metoda autoaplikace („self-administrace“).....	32
1.6.5	Metoda rozpoznávání drogy („drug discrimination“) .....	33
1.6.6	Metoda vyvýšeného křížového bludiště (elevated plus maze, EPM) .....	33
1.7	Ghrelin a jeho role v závislostech na návykových látkách.....	34
1.7.1	Ghrelin a alkohol.....	37
1.7.2	Ghrelin a nikotin.....	38
1.7.3	Ghrelin a stimulancia .....	38
1.7.4	Ghrelin a konopí / kanabinoidy .....	39
1.7.5	Ghrelin a opioidy.....	39
2.	Cíle a hypotézy disertační práce .....	40
3.	Metodika .....	42
3.1	Experimentální zvířata .....	42
3.2	Použité látky a materiály .....	42
3.3	In vivo CNS mikrodialýza.....	43
3.3.1	Akutní experiment.....	43
3.3.2	Experiment u potkanů senzitivizovaných opakovaným podáváním morfinu („sub-chronický experiment“) .....	44

3.3.3	Implantace dialyzační kanyly a testované skupiny zvířat.....	44
3.3.4	Průběh mikrodialýzy .....	47
3.3.5	Stanovení koncentrace dopaminu, jeho metabolitů a endokanabinoidů .....	47
3.4	Monitorování změn chování v průběhu in vivo mikrodialýzy .....	48
3.5	Monitorování morfinem podmíněné preference místa (CPP) .....	48
3.6	Monitorování spontánní aktivity (Open field - EthoVision) .....	49
3.7	Statistická analýza .....	50
4.	Výsledky .....	51
4.1	Účinky antagonisty GHS-R1A na akutním morfinem vyvolané vyplavení dopaminu v nucleus accumbens (Sustkova-Fiserova et al 2014).....	52
4.2	Účinky premedikace antagonistou GHS-R1A na akutním morfinem zvýšené koncentrace metabolitů dopaminu v nucleus accumbens (Sustkova-Fiserova et al 2014).....	53
4.2.1	3-MT .....	54
4.2.2	DOPAC .....	55
4.2.3	HVA .....	56
4.3	Účinky antagonisty GHS-R1A na morfinem indukované zvýšení extracelulární koncentrace anandamidu (AEA) v nucleus accumbens v akutním experimentu a během abstinence (Sustkova-Fiserova et al 2016) .....	58
4.3.1	Podání morfinu v akutních dávkách .....	58
4.3.2	Opakované podání morfinu během fáze morfinové abstinence.....	61
4.4	Účinky antagonisty GHS-R1A na morfinem indukované zvýšení extracelulární koncentrace 2-arachidonylglycerolu (2-AG) v nucleus accumbens v akutním experimentu a během abstinence (Sustkova-Fiserova et al 2016).....	62
4.4.1	Podání morfinu v akutních dávkách .....	62
4.4.2	Opakované podání morfinu během fáze morfinové abstinence.....	66
4.5	Účinky morfinu na uvolnění dopaminu a jeho metabolismus u morfinem senzitivizovaných potkanů (Jerabek et al 2017).....	67
4.6	Účinky antagonisty GHS-R1A na morfinem indukovanou dopaminergní senzitivizaci v NAC (Jerabek et al 2017).....	69
4.7	Účinky antagonisty GHS-R1A na morfinem indukované změny v koncentracích metabolitů dopaminu v NAC při aplikaci během morfinové abstinence (Jerabek et al 2017) .....	70
4.7.1	3-MT .....	70

4.7.2	DOPAC .....	70
4.7.3	HVA .....	71
4.8	Účinky antagonisty GHS-R1A na akutním morfinem indukované změny chování (Sustkova-Fiserova et al 2014, Sustkova-Fiserova et al 2016) .....	74
4.8.1	Ad výsledky obsažené v publikaci Sustkova-Fiserova 2014 – pozorované změny v chování vyjádřené v procentech .....	75
4.8.2	Ad výsledky obsažené v publikaci Sustkova-Fiserova 2016 – pozorované změny v chování podle kategorií .....	78
4.9	Účinky antagonisty GHS-R1A na morfinem navozenou behaviorální senzitivizaci (Sustkova-Fiserova et al 2016, Jerabek et al 2017).....	82
4.9.1	Ad výsledky obsažené v publikaci Sustkova-Fiserova 2016 – pozorované změny v chování podle kategorií .....	82
4.9.2	Ad výsledky obsažené v publikaci Jerabek et al 2017 - pozorované změny v chování vyjádřené v procentech.....	84
4.10	Účinky antagonisty GHS-R1A na ovlivnění spontánní aktivity potkanů (Jerabek et al 2017) .....	86
4.11	Účinky antagonisty GHS-R1A na ovlivnění morfinem podmíněné preference místa (Jerabek et al 2017).....	87
5.	Diskuse .....	88
5.1	Vliv podání JMV2959 na morfinem vyvolané uvolnění dopaminu v NACSh (Jerabek et al 2017, Sustkova-Fiserova et al 2014, Sustkova-Fiserova et al 2016).....	88
5.2	Vliv podání JMV2959 na morfinem vyvolané zvýšení extracelulárních koncentrací metabolitů dopaminu v NACSh (Jerabek et al 2017, Sustkova-Fiserova et al 2014, Sustkova-Fiserova et al 2016).....	91
5.3	Vliv podání JMV2959 na morfinem vyvolané změny v koncentracích hladin endokanabinoidů (AEA, 2-AG) v NACSh (Sustkova-Fiserova et al 2016).....	92
5.4	Vliv podání JMV2959 na změny chování (Sustkova-Fiserova et al 2014, Sustkova-Fiserova et al 2016).....	94
5.4.1	Ad výsledky obsažené v publikaci Sustkova-Fiserova et al 2014 – pozorované změny v chování vyjádřené v procentech .....	95
5.4.2	Ad výsledky obsažené v publikaci Sustkova-Fiserova et al 2016 – pozorované změny v chování podle kategorií .....	95
5.5	Vliv podání JMV2959 na morfinem navozenou behaviorální senzitivizaci (Sustkova-Fiserova et al 2016) a (Jerabek et al 2017).....	96
5.5.1	Ad výsledky obsažené v publikaci Sustkova-Fiserova et al 2016 .....	96

5.5.2	Ad výsledky obsažené v publikaci Jerabek et al 2017.....	97
5.6	Vliv podání JMV2959 na ovlivnění spontánní aktivity potkanů (Jerabek et al 2017) .....	98
5.7	Vliv podání JMV2959 na ovlivnění drogou podmíněné preference místa (Jerabek et al 2017) .....	98
6.	Závěr .....	99
7.	Seznam použité literatury.....	100
8.	Přílohy.....	112
8.1	Celkový seznam publikací autora.....	112
8.2	Seznam přiložených publikací.....	113

## Seznam zkratek:

2-AG	2-arachidonylglycerol
3-MT	3-metoxytyramin
ACSF	Umělá cerebrospinální tekutina (Artificial Cerebrospinal Fluid)
ADHD	Attention Deficit Hyperactivity Disorder
AEA	Anandamid (arachidonylethanolamid)
AMG	Amygdala
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
BNST	Bed nucleus of stria terminalis
CB1	Kanabinoidní receptor 1
CB2	Kanabinoidní receptor 2
CeA	Centrální amygdala (Central Amygdala)
COMT	Katechol-O-methyltransferáza
CPP	Podmíněná preference místa (Conditioned Place Preference)
CRF	Corticotropin-releasing factor
DA	Dopamin
DOPAC	3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina

EPM	Vyvýšené křížové bludiště (Elevated Plus Maze)
ExA	Rozšířená amygdala (Extended Amygdala)
FR	Fixní poměr (Fixed ratio)
GABA	Kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GHS-R1A	Growth Hormone Secretagogue Receptor 1A
GLU	Glutamát
HVA	Homovanilová kyselina
ICV	Intracerebroventrikulární
IVSA	Intravenózní self-administrace (Intravenous self-administration)
LDTg	Laterodorzální tegmentální oblast
LTD	Dlouhodobá deprese (Long-term depression)
LTP	Dlouhodobá potenciace (Long-term potentiation)
MAO	Monoaminoxidáza
MDMA	3,4-methylenedioxyamfetamin
MFB	Fasciculus medialis telencephali (Medial Forebrain Bundle)
MK-801	Dizocilpin
MO	Morfin
MPFC	Mediální prefrontální kůra (Medial Prefrontal Cortex)
NA	Noradrenalin
NAC	Nucleus Accumbens
NACSh	Nucleus Accumbens Shell
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
PCP	Fencyklidin
PR	Progresivní poměr (Progressive ratio)
THC	Tetrahydrokanabinol
VP	Ventrální palidum
VTa	Ventrální tegmentální oblast

# **1. Literární úvod a přehled problematiky**

## **1.1 Aktuální stav problematiky závislosti na návykových látkách**

Závislost na návykových látkách je v dnešní době stále přetrvávajícím problémem, jež postihuje asi 15,3 milionů obyvatel celého světa (Baimel et al 2015). V České republice dlouhodobě představují vedle závislých na alkoholu, tabáku a rizikových uživatelů konopí, největší problém problémoví uživatelé metamfetaminu (r. 2015 asi 34,2 tis.) a zhruba 12,7 tis. problémových (injekčních) uživatelů opioidů - převážně heroinu (4,5 tis. uživatelů), buprenorfinu (7,1 tis.) a nově stále častěji fentanylu (1,1-1,2 tis) (Mravčík 2016).

Závislost na návykových látkách je multifaktoriální chronické relabující onemocnění centrálního nervového systému, podle WHO klasifikace nemocí má označení MKN-10, F10 - F19 Poruchy duševní a poruchy chování vyvolané účinkem psychoaktivních látek (v ČR od r. 1994; aktualizace r. 2013). Společnost proti tomuto svízelnému onemocnění dosud nedokázala vyvinout a nastolit dostatečná preventivní opatření a stále nenachází dostatečně spolehlivý způsob, jak s již rozvinutou závislostí bojovat. V hledání efektivnějších preventivních a terapeutických strategií v problematice závislostí na návykových látkách je nejdůležitějším zdrojem informací komplexní mnohaúrovňový výzkum.

Závislosti na návykových látkách, tedy komplexní chronická onemocnění s řadou závažných zdravotních i sociálních dopadů a rizik, představují dlouhodobý, prakticky celospolečenský problém. Léčba i prevence závislostí má všeobecně nízkou úspěšnost, a proto se výzkumu nových efektivnějších přístupů věnuje stále velká pozornost. Výzkum neurobiologických mechanismů účinků návykových látek a adaptačních procesů, jež jsou základem závislostního chování, je důležitým zdrojem nových poznatků, jež se významně uplatňují ve vývoji účinné (farmako)terapie závislostí.

## 1.2 Význam hormonů regulujících příjem potravy

S ohledem na výše zmíněný přístup se nové výzkumné směry v drogové problematice začaly vedle jiných také orientovat na hormony regulující příjem potravy. Hormony **ghrelin**, **orexin**, **insulin** i **leptin** jsou látky s různým původem (orexin z hypothalamu, ostatní z periferních tkání) i s různými účinky (ghrelin a orexin příjem potravy stimulují, leptin a insulin tlumí). Všechny tyto peptidy aktivují receptory ve **ventrální tegmentální oblasti (VTA)**, mozkové struktuře, spojené s vnímáním odměny (Narayanan et al 2010). Z výše jmenovaných peptidů se zatím jako velmi nadějný pro závislostní terapii jeví **ghrelin**. Sekretagogové receptory pro růstový hormon (GHS-R1A), na něž se váže ghrelin, se nacházejí vedle VTA i v **nucleus accumbens (NAC)** (Landgren et al 2012), v mozkové struktuře zásadní pro zpracovávání (zejména počátečních) odměňovacích a posilovacích procesů spojených s užitím chutné potravy či návykových látek. Zatímco výzkumem úlohy ghreluinu v závislosti na alkoholu a některých stimulanciích se zabývá vzrůstající počet recentních vědeckých prací (Engel & Jerlhag 2014, Panagopoulos & Ralevski 2014, Spanagel 2009, Wurst et al 2007), u opioidní závislosti byly dosud tyto vztahy probádány pouze minimálně s mnohdy nekonzistentními výsledky (Panagopoulos & Ralevski 2014). Výše zmíněná fakta byla i důvodem výběru tohoto tématu pro zaměření mého postgraduálního studia.

## 1.3 Základní mechanismy závislosti na návykových látkách

### 1.3.1 Definice závislosti a faktory vzniku závislosti

Závislost na návykových látkách je chronicky recidivující onemocnění, často popisované jako „naprosté spojení se s užívanou látkou“, které je charakterizováno nutkáním hledat a užít drogu a je zároveň spojené se ztrátou kontroly nad omezováním příjmu této drogy. Projevuje se rovněž vznikem určitého negativního emocionálního stavu při odnětí drogy (př. dysforie, úzkost, podrážděnost), který odráží motivační vyhasnutí daného jedince a jeho prakticky výhradní orientaci na drogu (Koob & Le

Moal 1997, Šustková 2015).

Podle mezinárodní klasifikace nemocí by se definitivní diagnóza závislosti na návykových látkách (MKN-10; F10-F19) měla stanovit pouze tehdy, jestliže během jednoho roku došlo ke třem nebo více z následujících jevů:

- a) silná touha nebo pocit puzení užívat látku;**
- b) potíže v sebeovládání při užívání látky, a to pokud jde o začátek a ukončení, nebo množství látky;**
- c) somatický odvykací stav, jestliže je látka užívána s úmyslem zmenšit jeho příznaky;**
- d) průkaz tolerance k účinku látky (vyžadování vyšších dávek látek);**
- e) postupné zanedbávání jiných potěšení nebo zájmů ve prospěch užívané psychoaktivní látky;**
- f) pokračování v užívání látky přes jasný důkaz zjevně škodlivých následků.**

(Nešpor 2002)

Závislost na návykové látce se vždy nevyvine u každého uživatele drogy a níže popsané základní neurobiologické mechanismy se mohou u jedince uplatňovat a prosazovat různou měrou i různými způsoby. Citlivost a zranitelnost mozkových mechanismů i organismu jako celku k působení drogy, je dána kombinací řady faktorů vnějších i vnitřních (individuálních).

Mezi **vnějšími faktory**, jež přispívají ke vzniku drogové závislosti, jsou vedle absolutní dostupnosti drogy, prostředí, sociálního kontextu atp., vysoce rizikové různé typy stresu. Stres výrazně ovlivňuje příjem užívané drogy a naopak příjem drogy hluboce ovlivňuje stresové neuronální okruhy - resp. akutní i chronický nadměrný příjem drogy navodí změny v genové expresi se signalizačními účinky u molekul se vztahem k odměně a stresu, takže je ovlivněna transmise ve stresových i odměňovacích drahách, a zároveň lze pozorovat obdobný epigenetický vliv nadměrného akutního a



zejména chronického kumulativního stresu s dopadem na příjem drog, případně také potravy atp. (Koob & Le Moal 2008, Sinha & Jastreboff 2013).

Z **vnitřních (individuálních) faktorů** je třeba zmínit především a) drogově specifické i nespecifické vrozené (genetické) předpoklady, jež u predisponovaného jedince vystaveného určitému typu drogy mohou představovat až padesátiprocentní riziko navození drogové závislosti. Dále to je b) nezralost organismu, kdy období puberty a dospívání jsou neuro-vývojovou etapou charakterizovanou špatnou kontrolou chování a silným vyhledáváním limbické odměny, vzrušení, riskování, nových zážitků a sociálních interakcí, jež jsou nutné pro proces zrání, ale zároveň jsou prediktory pro užívání drog {alkoholu (Crews & Vetreno 2011)}. Období rané adolescence je nesmírně důležitou remodelační vývojovou fází, jež je zvýšeně citlivá k vnějším zásahům i psychiatrickým poruchám. Adolescenti např. méně pocítují sedativní efekt alkoholu, což usnadňuje jeho zvýšenou konzumaci („binge drinking“), zároveň jsou ale mnohem citlivější k alkoholové neurotoxicitě (např. ve frontální kůře se redukuje počet D1 a D2 dopaminergních receptorů a zvyšuje se zde, stejně jako v limbickém systému, histonová acetylace, dochází k poškození hipokampální neurogeneze atd.). Adolescenti, kteří zvýšeně konzumují alkohol, mají také menší objemy prefrontální šedé a bílé hmoty, což zároveň koreluje se špatnou náladou a horšími rozhodovacími schopnostmi (Crews & Vetreno 2011). Obdobně zvýšená zranitelnost je pozorována u adolescentů při užívání dalších drog (tabáku, marihuany, stimulantů atd.) (Koob & Volkow 2010). Je zřejmé, že masivní konzumace drog (alkoholu) v období puberty může mít u některých jedinců dlouhodobé, někdy až celoživotní negativní následky. Mezi rizikové faktory patří také c) ženské pohlaví, protože ženy jsou zejména k toxickému působení drog všeobecně citlivější, případně d) některá onemocnění a jiné poruchy, např. psychické poruchy – deprese, anxieta, ADHD, atp. (Kalina 2015, Šustková 2015). Dále je rovněž diskutován úzký vztah s imunitním systémem (Crews & Vetreno 2011). Zřejmé je i to, že při vzájemném kombinování možných faktorů se riziko navození i závažnost průběhu drogové závislosti zvyšuje (např. kumulativní stres

prožívaný v adolescenci u jedince s úzkostnou poruchou v kombinaci s nadužíváním alkoholu)

Příjem drogy je během drogové závislosti posilován pozitivními i negativními stimuly („positive reinforcement“ a „negative reinforcement“).

**Pozitivním posilovačem** příjmu drogy je jednak vlastní psychotropní efekt drogy, většinou spojený s příjemným prožitkem až slastí (pocit „high“ – přímé / nepodmíněné pozitivní posilování) a dále vliv prostředí resp. parafrází spojených s aplikací a efektem drogy (nepřímé / podmíněné pozitivní posilování).

**Negativním posilovačem** přímým / nepodmíněným je nepříjemný odvykací stav navozený vysazením drogy (psychické, někdy i tělesné abstinenční příznaky). Nepřímým / podmíněným negativním posilovačem mohou být různé na droze nezávislé nepříjemné stavy a pocity, které aplikace drogy může zmírnit či odstranit {např. různé typy sociálního stresu, bolest, nemoc, deprese, úzkostné stavy atd. (Kalina 2015)}.

### 1.3.2 Fáze závislosti na návykových látkách

V průběhu drogové závislosti jsou přítomny aspekty **impulzivních i kompulzivních** poruch. Poruchy kontroly impulzivity jsou spojeny s mechanismy pozitivního posilování. Impulzivita také souvisí s upřednostňováním malé okamžité odměny před opožděnou větší odměnou a s neschopností odměnu odložit. Kompulzivní poruchy jsou výrazně spojeny s negativním posilováním a automacií. Drogová závislost zahrnuje prvky impulzivity i kompulzivity, jež formují složený cyklus závislosti. Tyto komponenty se opakují a navzájem interagují.

Jedná se o:

- a) aplikaci / zaplavení organismu drogou („binge“; příjem do přebytku);**
- b) odnětí drogy / negativní dopad („withdrawal“);**
- c) zabývání se drogou / očekávání / „craving“ („preoccupation / anticipation“),**  
kde impulzivita dominuje v počátečních stádiích užívání drogy a kompulzivita převažuje ve stádiích pozdějších. Posun člověka z impulzivity do kompulzivity souvisí

s motivační změnou. Původní, pozitivním posilovačem (odměnou) motivované chování, se změnilo v chování motivované negativním posilovačem (negativními příznaky) a automaci (Koob & Volkow 2010). Uvedené komponenty drogové závislosti navzájem interagují a zintenzivňují se, až nakonec vedou k patologické závislosti, kde se tyto fáze střídají ve velké postupně devastující intenzitě (Koob & Le Moal 1997). Přejít od příležitostného užívání drogy k závislosti zahrnuje neuroplasticitu ve všech třech uvedených komponentách (Koob & Volkow 2010).

Klíčovou součástí drogové závislosti jsou změny v motivaci k droze (zvýšení, převaha) a ke zdrojům přirozené odměny (snížení), resp. k významným přirozeným stimulům, důležitým pro přežití organismu a rodu (chutná potrava, sex atp.).

Experimentální výzkum studuje zúčastněné neuronální okruhy i neuroplasticitu, jež může být podkladem přechodu užívání drog k závislostnímu chování (posun ze stavu „mít rád“ drogu ke „chtít drogu“).

Multicentrická podstata vzniku závislosti zahrnuje mozková centra, spojená se schopností učení, vnímání pocitů a schopností motivace a následné odměny („reward“), zahrnující ventrální tegmentální oblast (VTA), nucleus accumbens (NAC), amygdalu (AMG), frontální kortex a mnohé další struktury či substruktury uvedených center (Olds & Milner 1954). Klíčovou roli v přenosu signálu mezi těmito centry hraje **dopamin (DA)** (Crow 1973, Schultz 2007, Wise 1978), ale byly objeveny i non-dopaminergní, na dopaminu nezávislé, systémy s důležitou úlohou v neuronálních procesech závislosti (Hernandez et al 2006). Určité neuromediátory se více či méně podílejí na jednotlivých fázích závislosti (viz Obrázek č. 1):

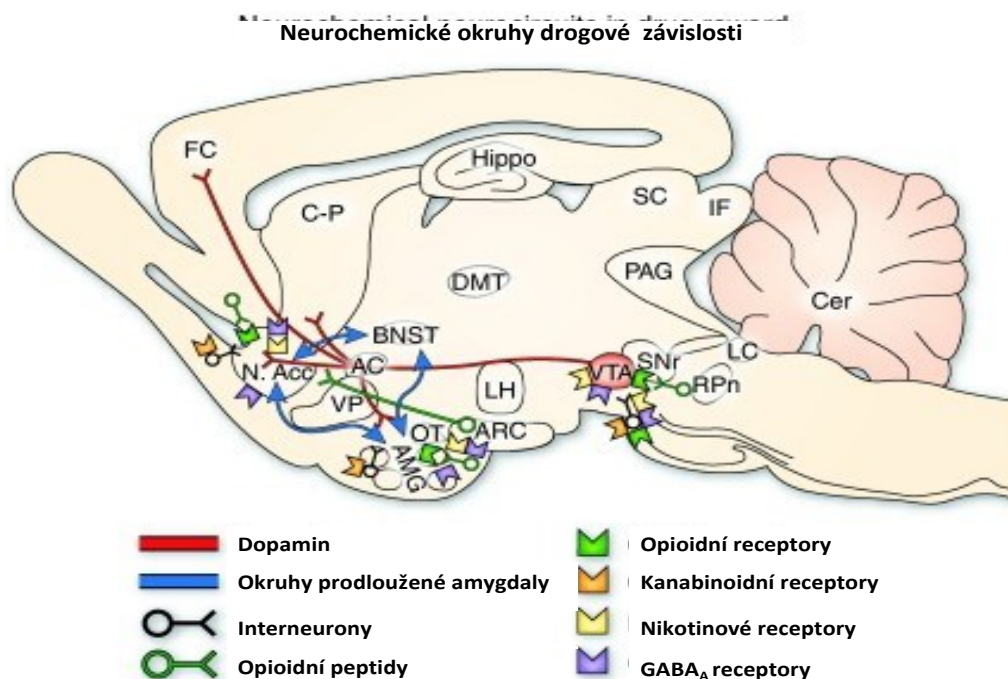
**aplikace** – DA, endogenní opioidy, endokanabinoidy, glutamát (GLU);

**withdrawal** – noradrenalin (NA), dynorfin, corticotropin-releasing factor (CRF);

**craving** – GLU.

Neurobiologických mechanismů závislosti se ovšem účastní celá řada dalších mediátorů a působků. Vzrůstající počet prací dokládá důležitou roli hormonů

ovlivňujících apetit v mechanismech závislosti na alkoholu, některých stimulancích a několik málo prací naznačuje či dokládá účast např. ghrelinu v mechanismech opioidní závislosti, včetně studií našeho pracoviště.



**Obrázek č. 1** (Koob & Volkow 2010)

Schématické znázornění neurochemických okruhů, podílejících se na vzniku drogové závislosti; schéma řezu potkaním mozkem.

Níže jsou uvedeny obecné charakteristiky jednotlivých fází závislosti:

### **1.3.2.1 Aplikace/zaplavení organismu drogou („binge“; příjem drogy do přebytku)**

Během této fáze, kdy se jedinec setkává s drogou, dochází k aktivaci VTA a ventrálního striata, včetně NAC. Zejména po akutní / nárazové aplikaci návykové látky dochází typicky k mohutnému vyplavení dopaminu v NAC. Tato dopaminergní dráha je součástí mozkového systému odměny a je aktivována i přirozenými zdroji odměny, jako je např. potrava, sex atp. Dopamin hraje klíčovou roli v přenosu signálu mezi centry mesolimbického systému (Crow 1973, Schultz 2007, Wise 1978). Již dříve byl pozorován velký rozdíl v množství uvolňovaného dopaminu ve fyziologickém stavu a

při užití návykových látek (Kalivas et al 1998, Kuczenski & Segal 1999, Tanda et al 1997). Vyplavení dopaminu v NAC přiřazuje důležitost stimulu / faktoru, který ho vyvolal a množství stimulem uvolněného dopaminu koreluje nejen s intenzitou odměny ale i s tím, zda efekt byl větší či menší, než daný jedinec předpokládal. Vyvolané změny jsou tedy automaticky porovnávány s prožitými zkušenostmi a zvýšení hladiny dopaminu jako známka důležitosti příslušného stimulu pro organismus okamžitě vyvolá kaskádu podmiňovacích procesů v řadě neuronálních mozkových okruhů, jež vedou k zapamatování si daného zdroje odměny (včetně cesty k němu), čímž se zvyšuje pravděpodobnost vyhledávání tohoto stimulu pro znovuprožití (opakování) odměny. Ve srovnání s přirozenými zdroji odměny, kdy se hladina dopaminu v NAC zvýší zhruba 15 - 20x, v maximu účinku drogy dochází až ke 100 i vícenásobnému zvýšení hladiny dopaminu. Efektu drogy tak mozek automaticky přiděluje mimořádnou důležitost a následné spuštění podmiňovacích mechanismů dokáže účinně korigovat jen neporušený, dobře fungující podkorový kontrolní a rozhodovací mechanismus. Systém kontroly / rozhodování je opakovánými aplikacemi drogy poškozován, poškozuje ho ale i stres a jiné faktory, a mozek se tak stále více adaptuje a orientuje na příjem drogy. Zhoršení funkce korových a podkorových oblastí souvisí i s adaptačním snížením počtu dopaminergních receptorů v NAC. V souvislosti s užíváním drog jsou patrné následné neuroplastické změny v řadě mozkových struktur, jež se účastní závislosti (Wolf 2002). Akutní podání drogy snižuje práh pro dosažení odměny („reward threshold“) (Kornetsky & Esposito 1979), zatímco chronické užívání drog tento práh zvyšuje a významně tak snižuje vnímavost vůči přirozeným zdrojům odměny.

Intenzitu pocíťované „odměny“ výrazně ovlivňuje kinetika dané zneužívané látky, resp. čím rychleji droga proniká do CNS a čím rychleji dojde k vyplavení dopaminu v NAC, tím intenzivnější je pocit odměny. Čím kratší je efekt dávky drogy (když vysoká hladina dopaminu v NAC rychle zase poklesne), tím větší je pravděpodobnost brzké aplikace nové dávky. Tyto faktory odráží způsob aplikace drogy a rozdílná dávkovací schémata u jednotlivých zneužívaných drog (Fowler et al

2008). Důležitý je význam prostředí a parafronálií, prvků / faktorů spojených s aplikací drogy a s navozenou odměnou (např. injekční stříkačka, cigareta, vůně kouře, cinkání skleniček atp.). Parafronalia patří mezi tzv. „cues“, připomínky drogy, jež jsou důležitými pozitivními posilovači v procesu závislosti. Při opakovaném / kontinuálním užívání drogy dochází často k projevům tolerance, naopak při užití drogy během období abstinence pozorujeme senzitivizaci mozkových systémů k působení drogy, včetně ještě většího vyplavení dopaminu v NAC. Senzitivizace významně přispívá k relapsům, k návratu k užívání drogy. Aktivita dopaminergních buněk je zejména u některých typů drog, např. u opioidů či alkoholu významně modulována  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinou, endokanabinoidy, glutamátem, endogenními opioidy a dalšími modulátory / mediátory, mezi něž patří, jak se v poslední době ukazuje, např. i ghrelin. U opioidů, ale i alkoholu, nikotinu, kanabinoidů atp. hrají v mechanismu závislosti důležitou roli také na dopaminu nezávislé mechanismy, za účasti GABA, GLU a možná i ghrelu. Znalosti mechanismů odměny, senzitivizace a příslušných modulačních možností se využívá při vývoji léčebných přístupů k jednotlivým závislostem a při vývoji nových léčiv k prevenci relapsů.

### **13.22 Odnětí drogy/negativní dopad („withdrawal“)**

Odnětí drogy představuje pro závislého jedince velmi nepříjemnou fázi deprivace, jež významně přispívá k opakování aplikace drogy. Odnětí drogy je spojené se změnami zejména v centru zvaném rozšířená amygdala (ExA). Rozšířená amygdala se skládá z bed nucleus of stria terminalis (BNST), centrální amygdaly (CeA) a části oblasti nucleus accumbens shell (NACSh), jež hraje důležitou roli i v pocíťování odměny („reward“). Rozšířená amygdala je důležitou emoční strukturou pro pocíťování strachu a bolesti (Heimer & Alheid 1991). Je propojena četnými nervovými zakončeními s klasickými limbickými (emočními) strukturami mozku s výstupy do extrapyramidového motorického systému (Alheid 2003). Během fáze odnětí drogy se projevuje snížení počtu D2 (Koob & Volkow 2010), nebo nově možná spíše snížení počtu D1 (Hirth et al 2016) dopaminových receptorů ve striatu, a zhoršení

rozhodovacích schopností a nadřazených kontrolních mechanismů. Například u psychostimulancií v této fázi dochází k psychomotorické retardaci, zhoršené náladě a celkově snížené schopnosti dosažení cíle, motivované přirozenými stimuly (Barr & Phillips 1999). Obdobu lze najít i u dalších typů závislostí. Při této fázi se z mediátorů účastní především NA a CRF jako stresový faktor, ale také ve větší či menší míře vasopresin, substance P, neuropeptid Y, nociceptin atp. (Koob & Le Moal 2008). Dynorfin, endogenní opioid, agonista k receptorů je v této fázi zodpovědný za pocit zhoršené nálady až dysforie, a to v přímém vztahu k dopaminu. Aktivace D1 receptorů navozuje aktivaci systému dynorfinu a dynorfin snižuje uvolňování dopaminu vazbou na k receptory na dopaminergních nervových zakončeních v NAC. Toto bylo prokázáno zejména u závislosti na kokainu, ethanolu a rovněž i opioidech (Koob 2009).

### **13.23    *Zabývání se drogou/očekávání/“craving“ („preoccupation/anticipation“)***

V této fázi již odezněly nejvýraznější časné abstinенční příznaky, ale riziko vzniku relapsu přetrvává. Zvířecí modely naznačují dva mechanismy navození cravingu, respektive dva důvody, jež vedou k návratu k droze:

#### **a) bažení vyvolané opětovnou aplikací drogy vycházející z předchozího užívání**

drogy a posilované paralelními stimuly („cues“) spojenými s jejím užíváním, a nebo

**b) bažení vyvolané působením akutního stresoru** nebo přetrvávajícím negativním emočním stavem během abstinence. Této fáze se účastní centra orbito-frontálního kortexu, dorsálního striata a basolaterální amygdaly, která ovlivňují schopnost rozhodování. Kontrolní mechanismy jedince jsou narušeny přes gyrus cynguli a frontální kortex, kde rozhodující úlohu hraje neuromediátor glutamát, v synergii s dopaminem (McFarland & Kalivas 2001). Zatímco glutamatergní dráhy vedou signál z prefrontálního kortexu do nucleus accumbens core, dopaminergní projekce vedou signál z VTA do mediálního prefrontálního kortexu, a GABA projekce z NAC do ventrálního pallida (Kalivas & O'Brien 2008). Pozornost závislého se v tomto stavu zaměřuje výlučně na drogu a je spojena s přechodem ze spontánního chování na chování nutkové (v rámci neuroadaptace). Tato fáze výlučného zaujetí drogou se zdá

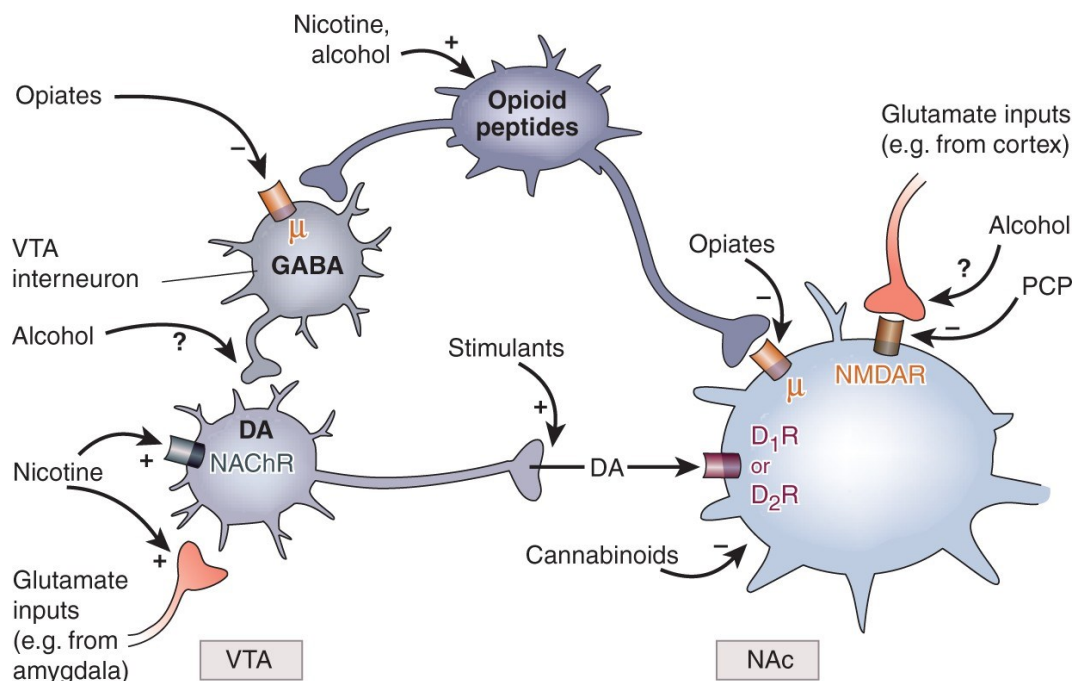
býti z hlediska farmakoterapeutické intervence nejperspektivnější, protože nabízí prostor pro vývoj látek zabraňujících vzniku relapsu. Díky komplikovanosti podílejících se neurobiologických mechanismů je ale vývoj nových anti-cravingových léčiv velmi obtížný. Dalším z důvodů je i to, že je relativně obtížné identifikovat craving klinicky (Tiffany et al 2000).

#### **1.4 Neurobiologické mechanismy opioidní závislosti**

Jak již bylo uvedeno, mozkový systém odměny tvoří synapticky propojené neuronální okruhy jež propojují ventrální tegmentální oblast (VTA), fasciculus medialis telencephali („medial forebrain bundle“, MFB), nucleus accumbens (NAC) a přilehlé struktury (včetně čichového tuberkulu), ventrální palidum (VP) a mediální prefrontální kůru (MPFC). Schopnost opioidů vyvolávat pocit odměny v souvislosti s vyplavením dopaminu v NAC je zprostředkována. Ve VTA i v NAC se nacházejí opioidní  $\mu$  receptory. Dopaminergní neurony ve VTA jsou tonicky inhibovány GABAergními interneurony, které opioidní  $\mu$  receptory exprimují. Vazba opioidů na  $\mu$  receptory způsobuje akutní inhibici GABA interneuronů, což vede k disinhibici dopaminergních projekčních neuronů, které uvolňují dopamin do struktury NAC a dalších zakončení (Barrot et al 2012, Nestler 2005). Navíc se  $\mu$  receptory (spojené s Gi proteiny obdobně jako D2 dopaminergní receptory) vyskytují v NAC a neuronech dorsálního striata. Opioidy mohou tyto receptory a příslušné neurony ovlivňovat touto cestou přímo. V mechanismech, jež zprostředkovávají pocit odměny při užívání opioidů, a jež jsou tedy důležitou součástí rozvoje a udržování závislosti, se vedle výše zmíněných dopaminergních mechanismů uplatňují i mechanismy na dopaminu nezávislé (viz Obrázek č. 2). Předpokládá se, nebo je již doložena, účast dalších neuronálních systémů v opioidních závislostních mechanismech, např. kooperace opioidního systému s kanabinoidním systémem v postsynaptické inhibici GABA trnitých interneuronů a / nebo ovlivnění glutamatergního systému v NAC atp. (Gardner 2005). Mezi mediátorové systémy, jež mohou ovlivňovat / modulovat opioidní



závislostní mechanismy, zdá se, patří i centrální signální systém hormonů ovlivňujících příjem potravy, včetně ghrelu. Znalost modulačních mechanismů, např. ghrelu, by bylo potenciálně možné využít v terapii závislosti na opioidech. Velmi důležitou komponentou drogové závislosti, včetně opioidní závislosti, je synaptická plasticita, procesy dlouhodobé potenciace (LTP) a dlouhodobé deprese (LTD), probíhající např. ve VTA, NAC a jinde za účasti zejména glutamatergní transmise. Ve své práci jsem se ale zabýval až následnými projevy těchto změn, tedy konkrétně změnami v koncentracích neuromediátorů a změnami v chování (behaviorálními změnami).



**Obrázek č. 2** (Hyman et al 2006)

Schématické znázornění, mimo jiné, odměny po podání opioidů, která je zprostředkována opioidními receptory  $\mu$ . Dopaminergní projekční neurony ve VTA jsou tonicky inhibovány GABAergními interneurony, které exprimují  $\mu$  receptory. Podané opioidy akutně inhibují tyto interneurony a tímto disinhibují výše zmíněné dopaminergní projekční neurony, které pak vypravují dopamin přímo do NAC.

## 1.5 Základní současné léčebné přístupy u opioidní závislosti

Podle mezinárodní klasifikace nemocí MKN 10 (aktualizace 2009 a další) má závislost na opioidech označení F11 Poruchy duševní a poruchy chování způsobené

užíváním opioidů. Terapie závislosti musí být vždy komplexní, pouze v případech závažných až život ohrožujících intoxikací opioidy je v praxi používán antagonist opioidního  $\mu$  receptoru, naloxon. Vedle případné farmakoterapie se ale uplatňují i různé vhodné formy psychoterapie, socioterapie, poradenství v oblastech pracovních a právních atp. Podle závažnosti stavu pacienta, fáze a intenzity opioidní závislosti a dalších faktorů má terapie po fázi detoxifikace buď charakter substituční léčby, nebo, bohužel méně často, úplné abstinence, vždy provázené doplňkovou terapií. Současným základním farmakoterapeutickým přístupem v léčbě závislosti na opioidech je substituce plnými nebo parciálními agonisty opioidního receptoru  $\mu$ . Již v rámci detoxifikace je závislý nejčastěji převeden na bezpečnější (ne-intravenózní) a kontrolované užívání jiného opioidu (metadon = plný  $\mu$ -agonista, buprenorfin = parciální  $\mu$ -agonista) a postupně je snaha redukovat celkově užívané dávky. V rámci detoxifikace jsou dále doplňkově užívány látky ze skupiny spasmolytik, betablokátorů a s velkou obezřetností benzodiazepiny (riziko zkřížené závislosti). Substituce metadonem či buprenorfinem může po mnoho let (někdy doživotně) umožnit pacientům plnohodnotné zapojení do běžného života a v některých zvláště úspěšných případech je přechodným obdobím k úplné abstinenci. V následné léčbě po detoxifikaci lze podle potřeby při souběžných častých poruchách spánku podávat antidepresiva s tlumivým efektem (trazodon, mirtazapin, agomelatin), nebo hypnotika bez závislostního potenciálu (melatonin, promethazin), malé dávky antipsychotika pro lepší zvládnutí stavu (quetiapin, levomepromazin), popř. je možná fytoterapie (meduňka lékařská atp.). Adekvátní přídatná farmakoterapie se užívá také v léčbě častých komorbidit, nebo duálních diagnóz (antidepresiva, neuroleptika atp.). Paralelně probíhá režimová léčba, psychoterapie a socioterapie. V některých zemích (např. Rusko) chybí možnost využití substituční terapie, takže i léčba abstinčních příznaků je obtížná. Tradičním problémem všude je vysoké riziko relapsu a otázka jeho prevence (Kalina 2015). Adiktologický výzkum se proto problematikou prevence relapsů závislosti velmi intenzivně zabývá, včetně hledání nových efektivnějších „anti-cravingových“

mechanismů a léčiv. Jedním z nových nadějných výzkumných směrů v této oblasti jsou centrální mechanismy peptidů regulujících příjem potravy, např. ghrelinu.

Předkládaná práce se proto zabývá výzkumem vztahů centrálních ghrelinových mechanismů a opioidní závislosti; např. výzkumem možností využití ghrelinového antagonizmu v terapii opioidní závislosti, zejména k prevenci relapsu.

## **1.6 Využití animálních modelů a moderních technik**

Progresivní rozvoj neurověd, intenzivní výzkum s využitím specifických experimentálních (především animálních) modelů a metod, využití vysoce citlivých zobrazovacích technik mozku (i u lidí), metod neurochemických (mikrodialýza CNS *in vivo*), molekulární biologie, genetiky atp., jsou stálým zdrojem velkého množství zásadních poznatků. I když se zpočátku výzkum neurobiologických mechanismů drogových závislostí hojně zabýval akutním efektem návykových látek (porovnávání neužívání drog vůbec oproti užívání drog), v posledních letech se zájem přesunul více k dlouhodobým (chronickým) studiím a porovnávání akutních a krátkodobých efektů drogy s chronickými efekty za různých podmínek, resp. jde o výzkum krátkodobých a dlouhodobých neuroadaptačních změn v mozku, které přispívají k relapsu (Kalina 2015, Pushkina 2014). Úkolem současného výzkumu je porozumět genetickým / epigenetickým, buněčným a molekulárním mechanismům, jež zprostředkovávají přechod / změnu z občasného, kontrolovaného užívání drogy na drogovou závislost, tedy ztrátu behaviorální kontroly nad vyhledáváním a příjmem drogy a prevence chronických relapsů po třeba i velmi dlouhé době abstinence (Koob & Volkow 2010).

K těmto účelům výborně slouží animální modely, které lze použít k základnímu ověřování hypotéz souvisejících s problematikou závislosti. Obor, který se zabývá chováním zvířat se nazývá etologie. Chování lze rozdělit na vrozené – instinkty, reflexy, přímo spojené se sebezáchovou nebo rozmnožováním a získané – toto jsou formy učení od jednoduchých (habituační, klasické podmiňování) po komplexní (operantní, prostorové a kontextuální úlohy). Chování zvířecího jedince závisí na

pohnutkách, motivaci a instinktivních vzorcích, emočním stavu jedince a schopnostech reagovat na skutečnost na základě předchozí zkušenosti.

Mezi základní kategorie chování, studované v laboratorních podmínkách, patří:

- *efektivita senzomotorického zpracování (sensorimotor gating)*
- *spontánní aktivita, lokomoce a explorace*
- *emocionalita*
- *učení a paměť*
- *sociální chování a interakce*

Tyto přístupy jsou využívány v kombinaci s chirurgickými, farmakologickými, genetickými, elektrofyziologickými, biochemickými či molekulárně biologickými technikami k testování hypotéz vztahu mezi nervovou činností a chováním.

### **1.6.1 Využití metody CNS mikrodialýzy u hlodavců**

Mikrodialýza je zavedená *in vivo* metoda odběru vzorků nízkomolekulárních látek v krvi a tkáních. Těmito látkami mohou být např. neurotransmitery a neuropeptidy, elektrolyty, nebo hormony (Pushkina 2014). Mikrodialyzační metoda může být rovněž použita k infuzi exogenních i endogenních látek do mozku a míchy (Zapata et al 2009). V adiktologickém výzkumu má nejširší použití mikrodialýza různých oblastí mozku. Technika mikrodialýzy je široce používána pro odběr vzorků a kvantifikaci neurotransmiterů, neuropeptidů a hormonů v mozku či na periférii (Chefer et al 2009). Neocenitelnou a unikátní výhodou mikrodialýzy je možnost provádět dlouhodobá, opakovaná měření změn neuromediátorů v příslušné struktuře nebo tkáni u volně se pohybujících zvířat a tím studovat změny v rámci chronických modelů či v průběhu jiných behaviorálních testů jako je např. autoaplikace, CPP, nebo sledovat reakci zvířete např. na farmakologické podněty (Šustková 2003, Torregrossa & Kalivas 2008). Mikrodialyzační systém se skládá z mikrodialyzační kanyly se semipermeabilní membránou, která je implantovaná do příslušné tkáně, dialyzační pumpy s perfuzním

roztokem (umělým tkáňovým mokem), a mikrozkušavky, do níž je dialyzát v určitých intervalech odebírán (viz Obrázek č. 3).



**Obrázek č. 3**

Umístění pokusných zvířat v průběhu experimentů.

Fyzikální podstatou mikrodialýzy je využití principu Fickova zákona difúze, pasivního průchodu molekul semipermeabilní membránou dle koncentračního gradientu, tj. z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o koncentraci nižší. Funkci semipermeabilní membrány plní mikrodialyzační sonda, která je velmi pomalu promývaná dialyzačním roztokem (roztok s nulovou koncentrací). Velikost pórů v membráně určuje její propustnost („cut off“ - většinou se užívá propustnost 5000–100 000 Daltonů). Sonda je zavedena do zkoumané oblasti (např. vybrané mozkové struktury). Póry semipermeabilní membrány mikrodialyzační sondy procházejí látky z extracelulární tekutiny do sondy a odtud jsou jímány (v určitých časových intervalech) do mikrozkušavky. Koncentrace sledovaných látek v dialyzátu se potom stanovuje příslušnou analytickou metodou, která musí být mimořádně citlivá, protože koncentrace látek v dialyzátu jsou velmi nízké (pmol koncentrace a nižší). Experimentální analytické možnosti jsou zásadním limitem této techniky (Darvesh et al 2011).

V adiktologickém výzkumu má technika CNS mikrodialýzy *in vivo* mimořádně důležité uplatnění při vývoji nových farmakoterapeutických směrů a postupů v léčbě závislostí. Mikrodialýza umožňuje moderování mediátorových změn

vyvolaných účinkem návykových látek, potenciálních receptorových agonistů a antagonistů atp. (Darvesh et al 2011). Vzhledem k neuronálním závislostním mechanismům je největší pozornost věnována výzkumu neurochemických změn v mezokortikolimbických obvodech, včetně ventrální tegmentální oblasti, nucleus accumbens, frontální kůry, striata, amygdaly atd. (Torregrossa & Kalivas 2008). Další výhodou metody je, že z jednoho vzorku lze současně stanovit koncentraci více látek najednou. Nejčastěji stanovovanými neurotransmitery v adiktologii jsou dopamin, glutamát, GABA, serotonin, noradrenalin, acetylcholin, peptidy, endogenní kanabinoidy atd. (Torregrossa & Kalivas 2008).

### **1.6.2 Monitorování spontánní aktivity (Open field)**

Systém monitorování aktivity v „otevřeném poli“ komplexně hodnotí pohybové a behaviorální aktivity potkanů a myši, které mohou korelovat s lokomotivní funkcí. Test je široce používán k posouzení úzkostného a průzkumného chování (Pruet & Belzung 2003). Hodnocení aktivity ukazuje, jak mohou látky ovlivňovat tělesné systémy (např. centrální nervový systém).

Pro ověření spontánní aktivity je experimentální zvíře umístěno do neznámého prostředí, kde jej začne aktivně prozkoumávat (explorace), což se projeví zvýšenou lokomocí (přemísťování) a orientačním chováním (očichávání, rearing). Po podání experimentální látky je navozena zvýšená úzkost. Tato úzkost se může projevit snížením explorace a thigmotaxí (preferencí pohybu podél stěn). Během experimentu je nezávislým pozorovatelem pozorována četnost výskytu těchto prvků: horizontální aktivita (lokomoce, thigmotaxe), vertikální aktivita (rearing), grooming (osobní hygiena – je opakem explorace a naznačuje známost prostředí), freezing (kompletní absence pohybu, kromě dýchání – je způsobena strachem). Dalšími projevy mohou být: očichávání, popř. i stereotypické chování po aplikaci látek, tzv. *wet dog shakes*.

Úroveň lokomoční a vertikální aktivity odráží stupeň celkové behaviorální aktivity. Např. po aplikaci agonistů dopaminergních receptorů (amfetamin, psychostimulancia) je pozorována hyperaktivita. Hyperlokomoce je pozorována po aplikaci antagonistů

NMDA receptorů např. fencyklidinu (PCP), nebo dizocilpinu (MK-801). Stereotypické chování se může vyskytovat např. po aplikaci apomorfínu, či vysokých dávkách látek se stimulčními účinky. Aplikace anxiolyticky působících látek thigmotaxi snižuje. Tento druh testu je obecně velice citlivý na látky snižující aktivitu zvířete (antagonisté dopaminergních a adrenergických receptorů).

### **1.6.3 Podmíněná preference místa (conditioned place preference, CPP)**

Podmíněná preference místa je metoda, při které je měřena míra motivace, nebo zkušenosti pokusného zvířete. Při této metodě je měřena doba, kterou zvíře tráví v oblasti, která byla spojena s určitým stimulem, z čehož se dá odvodit, že zvíře má o tento stimul zájem. Obdobný postup je možno použít pro měření tzv. „conditioned place aversion“, kdy je ovšem zvířeti aplikovaný stimul vnímán jako opačný – negativní (Sanchis-Segura & Spanagel 2006).

Metoda samotná je založena na vytvoření spojení (podmíněné vazby) mezi účinkem zkoumané látky a určitým definovaným prostředím, kde byla látka aplikována (Prus et al 2009). Samotné provedení je v setu tří vzájemně propojitelných komor, kde obě postranní komory jsou stejně velké, ale jinak jednoznačně rozlišitelné (např. jedna komora má hladké dno a vertikální pruhy na stěnách, druhá komora má dno tvořené roštem a stěny jednobarevné atp.). Menší a vzhledově neutrální centrální komora je od obou postranních komor oddělená gilotinovými / odstranitelnými dveřmi, jež umožňují propojení všech tří komor. Metoda conditioned place preference zahrnuje tři kroky. V prvním kroku pokusu se zvíře umístí do centrální komory, otevře se propojení mezi komorami a určuje se doba, kterou zvíře stráví v každé z postranních komor (většinou procenta z celkového měřeného času = 100 %). Komora, ve které zvíře stráví méně času (= nepreferované prostředí) se určí jako komora, v níž bude posléze aplikována zkoumaná látka. Druhým krokem pokusu je fáze několika denního podmiňování (párování, spojování) aplikace resp. účinku testované látky s nepreferovanou komorou. Většinou je v této fázi střídavě zvířetem původně preferovaná komora párována s aplikací placebo (nejčastěji 0,09% roztok chloridu sodného). Během třetího kroku

probíhá vlastní testování. V průběhu testování se zvířeti neaplikuje žádná látka ani placebo. Zvíře je znovu umístěno do centrální komory s otevřenými vstupy do obou postranních komor a sleduje se čas strávený v každé ze dvou postranních komor. Jako „drogou podmíněná preference místa“ se označuje výsledek testu v případě, že zvíře stráví statisticky významně více času v komoře, ve které dostávalo v podmiňovací fázi pokusu testovanou látku. Pokud ale zvíře stráví významně více času v komoře spárované s placebem, znamená to, že testovaná látka má averzivní účinky – „podmíněná averze místa“ („conditioned place aversion“) (Gardner 2008, Planeta 2013, Prus et al 2009). Preference jednoho prostředí před druhým nám poskytuje informaci o motivačním účinku zkoumané látky. Jestliže zkoumaná látka vyvolává stav libosti, můžeme očekávat, že pokusné zvíře stráví více času v komoře, ve které tuto látku opakovaně dostávalo (Lynch et al 2010). Výsledek testu je dán typem léku, způsobem podání i velikostí dávky. Některé návykové látky navozují jak „conditioned place preference“, tak i „conditioned place aversion“ v závislosti na velikosti aplikované dávky. Dalším důležitým kritériem je latence účinku a délka trvání účinku. Látky s dlouhou latencí účinku a dlouhým působením nemají tak výrazné odměňovací vlastnosti na rozdíl od látek, které mají rychlý nástup účinku a krátký efekt (Bardo & Bevins 2000, Prus et al 2009). Tato metoda je vhodná pro testování přítomnosti odměňovacích, nebo averzivních účinků spojených s aplikací látky/drogy, porovnání potenciálu látek vyvolávat závislost a potenciálu látek či jiných parametrů k navození drogového relapsu (návratu k droze), případně testovat potenciální léčiva, jež by touhu po droze snížila (Gardner 2008, Liu et al 2008, Lynch et al 2010).

#### **1.6.4 Metoda autoaplikace („self-administrace“)**

Metoda „autoaplikace“ („self-administrace“) je nejvíce akceptovaným modelem závislosti a je považována za „zlatý standard“ testování potenciálu látky závislost vyvolávat (Carter & Griffiths 2009). Látky, jež vyvolávají závislost u lidí, jsou autoaplikovány i ve zvířecích modelech (Mello & Negus 1996). Metoda patří mezi tradiční behaviorální modely, odhalující působení drogy jako pozitivního odměňovače



(„reinforcer“), který je potentnější než „odměňovače přírodní“, jako např. potrava, voda, sex (Lynch et al 2010). Principem metody je dosažení odměny (dávka návykové látky) podmíněné vykonáním určitého úkolu (nejčastěji stlačení páčky, výběr správného otvoru, správná identifikace a výběr nádoby s drogou atp.) (Fišerová 2000, Sanchis-Segura & Spanagel 2006).

V současné době je tato metoda využívána naší výzkumnou skupinou, ale pro dosažení výsledků obsažených v této práci nebyla využita.

#### **1.6.5 Metoda rozpoznávání drogy („drug discrimination“)**

Metoda „rozpoznání látky mezi různými látkami“ („drug discrimination“) patří mezi validní behaviorální techniky používané v adiktologii. Často se používá v kombinaci s metodou „autoaplikace“ a „preference místa“ (Stolerman et al 2011). Základem této metody je schopnost vyšších živých organismů (např. hlodavců a primátů) rozlišovat různé typy centrálních účinků, resp. různé typy stavu vědomí, ve kterém se nacházejí. Podkladem metody je model naučeného operantního podmiňování. Test „drug discrimination“ zkoumá subjektivní účinek návykové látky na živý organismus.

Tato metoda nebyla využita pro dosažení výsledků obsažených v této práci.

#### **1.6.6 Metoda vyvýšeného křížového bludiště (elevated plus maze, EPM)**

Test na vyvýšeném křížovém bludišti (EPM) byl původně vyvinut k vyhodnocení příznivých účinků anxiolytických léčiv u potkanů a následně byl aplikován na myši (Lister 1987, Pellow et al 1985). Tento model je založen na použití křížové plošiny skládající se ze dvou otevřených a dvou uzavřených ramen umístěných 50-70 cm nad zemí. Během pokusu je pokusné zvíře umístěno doprostřed plošiny a to mu umožňuje po určitou dobu volně prozkoumávat nové prostředí. Konflikt mezi vrozenou zvědavostí prozkoumat nové prostředí a strachem z otevřeného ramene bludiště pak umožňuje stanovení stavu úzkosti zvířete. Počet vstupů a čas strávený v

otevřených ramenech ve srovnání s časem stráveným v ramenech uzavřených poskytuje odhad jeho úzkostného chování (Lister 1987, Pellow et al 1985).

Tato metoda rovněž nebyla využita pro dosažení výsledků obsažených v této práci, uvádím jí zde pouze okrajově pro ucelenou představu o používání animálních modelů ve výzkumu drogové závislosti.

## **1.7 Ghrelin a jeho role v závislostech na návykových látkách**

Závislosti na návykových látkách bývají spojené se závažnými poruchami příjmu potravy. Kompulzivní přejídání u obézních jedinců sdílí řadu podobností se ztrátou kontroly a kompulzivním příjmem drog u závislých na návykových látkách (Davis & Carter 2009, Wang et al 2004). Zdá se, že odměňovací vlastnosti chutné potravy a návykových látek jsou regulovány stejnými mozkovými strukturami a excesivní konzumace potravy i drog vyvolává podobné neuroadaptační změny v mozkovém systému odměny a příslušných neuronálních okruzích (Kenny 2011). Z těchto souvislostí vychází i jeden z nových a zatím velmi nadějných výzkumných směrů v adiktologii, jež studuje možné uplatnění centrálních mechanismů ghreluinu v mechanismech závislosti a jeho potenciálního budoucího využití v terapii. Největší pozornost byla dosud věnována vztahům ghreluinu a alkoholové závislosti a doposud publikované výsledky dokládají potenciální možnost využití ghrelinového antagonizmu v prevenci alkoholového relapsu. Výzkum v této oblasti nadále pokračuje. Několik prací dokládá také účast ghreluinu v závislostních mechanismech u nikotinu, kokainu či amfetaminu.

**Ghrelin** je orexigenní hormon, který se skládá z 28 aminokyselin a je primárně produkován v žaludku (Kojima et al 1999, Sakata et al 2002), ale v malých množstvích i v mozku (Cowley et al 2003, Korbonits et al 2001). Ghrelin jako cirkulující hormon má silný vliv na velké množství tělesných systémů (Kojima & Kangawa 2006). Mezi jinými je nutno zdůraznit vliv na apetit, zvýšení příjmu potravy a s tím spojený nárůst tělesné hmotnosti. Zařazením se jedná se o agonistu GHS-R1A, který zvyšuje hladiny

růstového hormonu (Kojima et al 1999, Kojima et al 2001). Aktivní forma ghreluinu je unikátní mezi známými peptidickými hormony savců, protože obsahuje n-oktanoyl posttranslační modifikaci, která je nezbytná pro účinek na GHS-R1A. Díky tomuto je ghrelin známý jako *acyl*, *acylovaný*, *nebo n-oktanoyl ghrelin*. Sekundární forma, *des-acyl ghrelin*, neobsahuje část n-oktanoylu, neváže se na GHS-R1A a není tak významně biologicky aktivní. (Hosoda et al 2000, van der Lely et al 2004). Souhrně bývají tyto formy v literatuře často označovány jako „celkový ghrelin“. Centrálním ghrelinovým signálním systémem jsou nazývány ty části CNS, které jsou ovlivňovány, ať už přímo, nebo nepřímo, působením ghreluinu na GHS-R1A. GHS-R1A je rozšířen v celé řadě mozkových oblastí a struktur, jako je např. hypothalamus, mozkový kmen, tegmentum a hippocampus, mesolimbický systém atp. (Guan et al 1997, Zigman et al 2006). GHS-R1A disponuje vlastní konstitutivní aktivitou, pokud není obsazen ghrelinovým ligandem (Holst et al 2003, Holst & Schwartz 2004). Aktivita tohoto receptoru tak může být potlačena nejen jeho přímým antagonistou, ale rovněž na ghrelinu nezávisle, např. použitím inverzního agonisty. Regulace sekrece ghreluinu je komplexní záležitostí, která je ovlivněna různými akutními a chronickými stimuly jako je např. hladovění nebo hypoglykémie (Toshinai et al 2001, Tschop et al 2000). Exprese ghrelinové mRNA je zvyšována podáváním inzulínu a leptinu. Sekrece ghreluinu je inhibována příjmem potravy a podáním glukózy, nebo podáním analog somatostatinu (Saad et al 2002). V dlouhodobých klinických studiích byla paradoxně prokázána trvale snížená hladina ghreluinu u obézních (Cummings et al 2002, Tschop et al 2001) a trvale zvýšená hladina při kachexii (Nagaya et al 2001, Otto et al 2001, Wisse et al 2001).

V humánních studiích bylo prokázáno, že hladina ghreluinu je zvýšená před příjmem potravy a naopak po jejím příjmu dramaticky klesá. Bylo prokázáno, že ghrelin působí jako signalizační iniciátor příjmu potravy při hladovění, který předává signál ze žaludku do mozku, aby zachoval energetickou rovnováhu organismu a udržel homeostázu. Zároveň ghrelin zesiluje příjemné pocity spojené s požitím chutné potravy svým působením na mezolimbický dopaminergní systém, a tím zvyšuje motivaci pro její obstarávání (Cummings et al 2007, Jerlhag et al 2007). Motivace, cílené chování a

motorická kontrola v souvislosti s příjmem potravy se významně uskutečňuje přes již zmiňované dopaminergní projekce z VTA do NAC a dalších mozkových struktur (Wise 2006). Ghrelin tedy funguje jako tzv. cirkulující hormon hladu, referující o energetickém deficitu a interagující s klíčovými strukturami zajišťujícími homeostázu (hypothalamus, mozkový kmen). Zároveň ghrelin aktivuje dráhy nehomeostatické, kterými ovlivňuje motivační aspekty příjmu potravy. Ve studii (Tang 2011) podání ghreluinu způsobovalo dokonce větší ochotu lidí za jídlo zaplatit penězi. Injekční aplikace ghreluinu do mesolimbických oblastí mozku souvisejících s odměnou (VTA a NAC) navodila aktivaci těchto oblastí, což dokládá zapojení ghrelinového signálního systému do mechanismu odměny (Egecioglu et al 2010, Naleid et al 2005). Ghrelin aktivuje laterodorzální tegmentální oblast (LDTg), což způsobuje vylití acetylcholinu do VTA. Zde acetylcholin aktivuje místní cholinergní nikotinové receptory a navodí tak uvolnění dopaminu v NAC (Jerlhag et al 2006, Jerlhag et al 2008, Jerlhag et al 2012, Rada et al 2000). Je známo, že dysfunkce této cholinergně-dopaminergní dráhy odměny je spojena se závislostním chováním, včetně kompulzivního přejídání a pití alkoholu. Jiná data dokládají, že schopnost ghreluinu zvyšovat elektrickou aktivitu na dopaminergních neuronech ve VTA souvisí s glutamatergní aktivací na NMDA receptorech v téže oblasti, což bylo potvrzeno snížením hladiny postprandiálně zvýšeného dopaminu ve VTA, po zablokování NMDA receptoru (Abizaid et al 2006). Spojení, vedoucí z laterálního hypothalamu, kde se GHS-R1A hojně vyskytuje, do VTA a NACSh, hraje také důležitou roli v regulaci procesů spojených s odměnou a příjmem potravy (Urstadt et al 2013a, Urstadt et al 2013b).

Řada studií naznačuje vzájemný vliv mezi chutnou potravou a návykovými látkami, kdy bylo poukázáno na to, že hladovění může zesilovat efekt mnoha těchto látek (Carroll 1998) a naopak příjem potravy redukuje touhu tyto látky užívat (Carroll & Lac 1998). Chutná potrava i akutní podání návykových látek stimuluje stejné mozkové oblasti. Ghrelin zesiluje chování, které vede k získávání přirozené odměny a zdá se, že stejným mechanismem podporuje i získávání odměny nepřirozené (bažení, craving) při užívání návykových látek (Jerlhag et al 2010). Rovněž stále více recentních

prací dokládá, že vedle příjmu potravy hraje ghrelin významnou roli v procesech odměny v mechanismech závislosti na některých návykových látkách (viz níže).

### **1.7.1 Ghrelin a alkohol**

Ghrelin zvyšuje a ghrelinový antagonismus snižuje konzumaci i autoaplikaci (intravenózní i perorální) alkoholu u hlodavců s dlouhodobou historií spontánního příjmu alkoholu (Kaur & Ryabinin 2010, Landgren et al 2012, Suchankova et al 2013). Např. studie Suchankové et al (Suchankova et al 2013) dokládá, že jednorázová aplikace antagonisty GHS-R1A (látky JMV2959, 1 a 3 mg/kg i.p.) i opakované aplikace této látky po dobu 10 dní významně snížily spontánní perorální příjem alkoholu bez projevů tolerance k účinku antagonisty GHS-R1A a bez výskytu tzv. rebound zvýšení příjmu alkoholu po ukončení aplikací JMV2959 (Suchankova et al 2013). Další studie prokázala, že podáváním alkoholu podmíněná preference místa (CPP), lokomotorická stimulace a volná konzumace alkoholu (two-bottle choice drinking paradigm) byly sníženy u ghrl knockoutovaných myší a myší premedikovaných antagonistou GHS-R1A v porovnání s kontrolní skupinou (Bahi et al 2013). Dále bylo prokázáno, že u ghrl knockoutovaných myší vzrostly hladiny dopaminu v NAC po požití alkoholu (Bahi et al 2013, Jerlhag & Engel 2011). ICV aplikace acyl-ghrelinu zvýšila příjem alkoholu, potravy a tekutin u divokého typu heterozygotních a homozygotních ghrl knockoutovaných myší.

I když výsledky několika klinických studií nejsou úplně jednotné, většinou byly u závislých na alkoholu v době počáteční abstinence a cravingu nalezeny zvýšené krevní hladiny ghrelinu ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých jedinců (Addolorato et al 2006, Wurst et al 2007).

V rámci výzkumů směřujících k využití v terapii závislosti byly vztahy mezi ghrelinem a alkoholovou závislostí zatím studovány nejčastěji. V rámci výzkumu u alkoholové závislosti probíhají letos již počáteční klinické studie s inverzním agonistou GHS-R1A, látkou PF-5190457, která, jak se zdá, zatím odpovídá přísným požadavkům na léčivo pro klinickou praxi (Lee et al 2018). Zatím pouze preklinický výzkum účasti

ghrelinových mechanismů probíhá s menší intenzitou i v oblasti jiných typů závislosti (viz níže).

### **1.7.2 Ghrelin a nikotin**

Studii, zabývajících se vztahem mezi ghrelinem a příjmem nikotinu je mnohem méně, než u alkoholu. Studie, jež sledovala vliv cigaretového kouře ad libitum po čtyři týdny na laboratorní potkaní samce ukázala, že v izolované krvi zvířat inhalujících cigarety byly zvýšeny hladiny acyl-ghrelinu v porovnání s kontrolou, ale hladiny desacyl ghrelinu nebyly tímto podáváním ovlivněny (Tomoda et al 2012). Po jednorázovém podání antagonisty GHS-R1A bylo pozorováno snížení lokomoční stimulace, CPP a snížení uvolňování extracelulárního dopaminu v NAC u myši, kterým byl podáván nikotin (Jerlhag & Engel 2011).

### **1.7.3 Ghrelin a stimulancia**

Studie s kokainem demonstrují, že po podání acyl-ghrelinu byla zvýšena kokainem navozená preference místa (CPP) u potkanů, kterým byl podán kokain v nižších dávkách, než jsou dávky nutné pro nastolení CPP za běžných podmínek bez premedikace ghrelinem. Potkani, kterým byl podáván kokain ve vyšších dávkách naopak již CPP po premedikaci ghrelinem nevykazovali (Davis et al 2007). Výsledky těchto studií nasvědčují tomu, že acyl-ghrelin je zodpovědný za efektivní snižování prahové dávky kokainu, potřebné pro vyvolání CPP. Bylo prokázáno zvýšení kokainové lokomotorické stimulace po podání ghrelinu (Wellman et al 2005). Dále pak bylo prokázáno, že sedmidenní podávání ghrelinu významně zvýšilo efekt jednorázového podání kokainu na lokomoční aktivitu již 1. den po skončení sedmidenního podávání. Tato pozorování vedou k závěru, že ghrelin zde funguje jako mediátor senzitivace hyperlokomotorického efektu kokainu (Wellman et al 2008).

Akutní dávka metamfetaminu nebo MDMA ve většině případů zvýšila u potkanů s volným přístupem k potravě plazmatické hladiny ghrelinu oproti placebo (Crowley et al 2005).

#### **1.7.4 Ghrelin a konopí / kanabinoidy**

Je známo, že endokanabinoidní systém, stejně jako exogenní kanabinoidy např. tetrahydrokanabinol (THC), ovlivňuje apetit a příjem potravy skrze kanabinoidní receptory (CB1) (Kirkham 2005, Kirkham & Williams 2001). Již dříve bylo prokázáno, že CB1 antagonisty snížil zvýšenou hladinu cirkulujícího acyl-ghrelinu u potkanů s potravní deprivací. Podání CB1 antagonisty ztlumilo sekreci růstového hormonu (Al-Massadi et al 2010). V samostatných pokusech, zkoumajících vliv na AMP-aktivovanou proteinkinázu (AMPK), enzym, regulující příjem potravy a energetickou rovnováhu, bylo zjištěno, že aktivita tohoto enzymu byla ovlivněna jak ghrelinem tak i kanabinoidy. AMPK by tedy mohla být mediátorem orexigenních efektů kanabinoidů a ghrelinu (Kola et al 2005). Je zajímavé, že podání CB1 antagonisty u potkanů zablokovalo orexigenní efekt centrálně (intracerebroventrikulárně) podaného ghrelinu. Centrální podání ghrelinu u myši zvýšilo v pokusu příjem potravy, aktivitu AMPK a přítomnost endokanabinoidů v hypothalamu. Podání kanabinoidního antagonisty rimonabantu tyto efekty zvrátilo (Kola et al 2005).

#### **1.7.5 Ghrelin a opioidy**

Opioidní systém je důležitou složkou v regulaci systému odměny při příjmu potravy. Kupříkladu agonista opioidního  $\mu$  receptoru zvyšuje příjem potravy, její chutnost a vůbec vůli vykonávat činnost za účelem jejího dosažení (Doyle et al 1993, Grigson 2002, Skibicka & Dickson 2011). Některé klinické studie dokládají, že po podání antagonistů opioidního  $\mu$  receptoru došlo ke snížení libých pocitů a vůně potravy a ke snížení preference pro sladkou, vysokoenergetickou potravu.

V několika málo publikovaných pracích s problematikou ghreluinu a opioidní závislosti bylo zjištěno, že např. intracerebroventrikulární (ICV) podání ghreluinu významně zvýšilo u intravenózní self-administrace heroinu maximální počet prázdných stlačeních („break point“) pro dosažení dávky heroinu v progresivním uspořádání sezení (PR, „progressive ratio“) a také (na hranici významnosti) zvýšilo příjem heroinu, resp. počet stlačeních aktivní páčky. Lokální aplikace (ICV) peptidického GHS-R1A antagonisty ale nesnížila intravenózní selfadministraci heroinu (Maric et al 2012).

Práce Engel a kol. (Engel et al 2015), jež byla publikována v době naší obdobné publikace, ale s potkany (Jerabek et al 2017), v pokusech u myší doložila, že antagonist GHS-R1A (látko JMV2959) významně ztlumil schopnost akutní aplikace morfinu navodit behaviorální stimulaci, vyplavení dopaminu v NAC a preferenci místa. Aplikace JMV2959 výrazně zvýšila extracelulární hladiny vybraných endogenních opioidů ve VTA, hippocampu a striatu.

## **2. Cíle a hypotézy disertační práce**

Předkládaná disertační práce se věnuje úzké problematice nového perspektivního výzkumného směru, kterým je studium možnosti využití ghrelिनových mechanismů v léčbě závislostí na návykových látkách, konkrétně na opioidech. Předkládaná práce shrnuje nejzákladnější obecné principy neurobiologických mechanismů závislosti na návykových látkách a základní léčebné směry a postupy, které z těchto poznatků vycházejí. V práci je uváděna jedna z nejužívanějších definic závislosti jako onemocnění spolu s faktory, které k jejímu vzniku a průběhu přispívají. V hlavních rysech jsou zde popsány jednotlivé opakující se fáze (cykly) závislosti na návykových látkách spolu s popisem předpokládané účasti jednotlivých mozkových struktur a základních neuromediátorů, které se těchto fází účastní.

Cílem této disertační práce je charakterizace dosud minimálně probádaných vztahů mezi ghrelinem a opioidní závislostí. Jak vyplývá z výše uvedených úvodních publikovaných studií, předpokládali jsme, že centrální ghrelिनové mechanismy by se



mohly uplatňovat i v neurobiologických mechanismech opioidní závislosti. Hlavními cíli naší práce bylo ve vybraných experimentech otestovat následující hypotézy:

- 1) Zda premedikace GHS-R1A antagonistou před akutní aplikací morfinu významně sníží uvolnění dopaminu v NAC u potkanů a současně významně ovlivní metabolizaci dopaminu.
- 2) Zda premedikace GHS-R1A antagonistou před akutní aplikací morfinu významně ovlivní hladinu endokanabinoidů anandamidu a 2-AG v NAC u potkanů.
- 3) Zda premedikace GHS-R1A antagonistou významně sníží morfinem vyvolanou dopaminergní senzitivizaci v NAC u potkanů a současně významně ovlivní metabolizaci dopaminu.
- 4) Zda premedikace GHS-R1A antagonistou při aplikaci během morfinové abstinence významně ovlivní hladinu endokanabinoidů anandamidu a 2-AG v NAC u potkanů.
- 5) Zda premedikace GHS-R1A antagonistou významně ovlivní akutní aplikací morfinu vyvolané změny v chování u potkanů.
- 6) Zda premedikace GHS-R1A antagonistou významně ovlivní morfinem navozenou behaviorální senzitivizaci u potkanů.
- 7) Zda premedikace GHS-R1A antagonistou významně ovlivní spontánní aktivitu potkanů.
- 8) Zda premedikace GHS-R1A antagonistou významně ovlivní morfinem podmíněnou preferenci místa u potkanů.

Pro ověření výše uváděných hypotéz byl zvolen model morfinové závislosti u potkanů a standardně využívaný experimentální antagonist GHS-R1A, látka s označením JMV2959.

Podrobnosti výzkumu jsou uvedeny níže. Výsledky jsou uváděny v informačních celcích s odkazem na příslušnou publikaci.

### **3. Metodika**

#### **3.1 Experimentální zvířata**

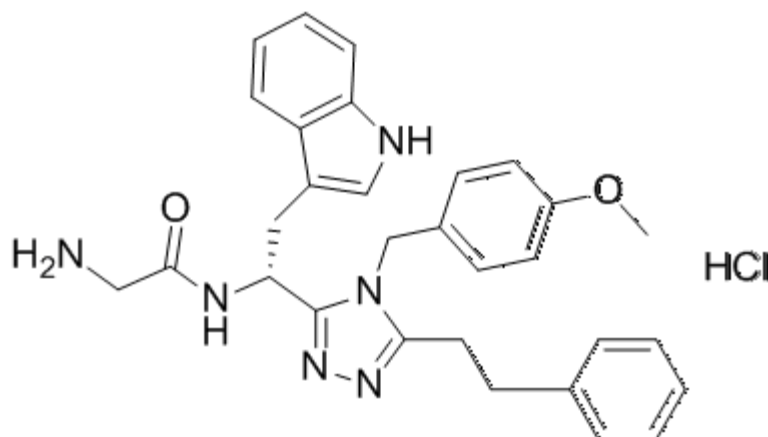
Pro všechny experimenty byli použiti potkaní samci kmene Wistar (Velaz, Anlab Czech Republic), přibližného stáří 8 týdnů a o váze 200 – 250 g. Těmto zvířatům byl umožněn volný přístup k vodě a potravě a tato zvířata byla umístěna v polykarbonátových boxech s konstantně monitorovanou vlhkostí (50 – 60%) a teplotě 22 – 24 °C s dvanáctihodinovým cyklem střídání světla a tmy, minimálně 7 dní před začátkem experimentu. Experimenty byly prováděny od 8 do 15 hod. Skupina 6 potkanů byla vždy použita pro CNS mikrodialýzu, skupina 14 – 15 potkanů pro CPP a skupina 9 potkanů pro „open field“ test.

Veškeré procedury s pokusnými zvířaty byly prováděny v souladu s mezinárodními zákony; experimentální protokoly respektovaly Směrnici Evropského parlamentu a rady (86/609/EU) a Směrnici EU (2010/63/EU) a probíhaly podle postupů Národního výboru pro péči a používání laboratorních zvířat. Experimenty byly schváleny Expertní komisí pro ochranu pokusných zvířat 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Po celou dobu byl dodržován Zákon České národní rady na ochranu zvířat proti týrání (č. 246/1992 Sb.).

#### **3.2 Použité látky a materiály**

Chlorid morfinu (morfin) byl zakoupen od společnosti Dr. Kulich Pharma (ČR). JMV2959 (1,2,4 – triazolový derivát), který je považován za antagonistu GHS-R1A (Moulin et al 2007) byl poskytnut Dr. Antonem Bepalovem (AbbVie, SRN, struktura molekuly, viz Obrázek č. 4). Ghrelin potkaního původu byl zakoupen od společnosti Essence Line, s.r.o. (ČR). Látky byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku a fyziologický roztok byl rovněž použit jako placebo. Morfin (5 nebo 10 mg / kg) byl podáván subkutánně (s.c.) v objemech 0,1 ml / 100 g tělesné hmotnosti zvířete. Vybrané dávky JMV2959 (3 a 6 mg / kg) byly stanoveny na základě našich předchozích studií potkanů kmene Wistar (Sustkova-Fiserova et al 2014, Sustkova-Fiserova et al

2016) a literatury (Clifford et al 2012, Jerlhag et al 2010). Nižší koncentrace JMV2959 (3 mg / kg) neměla žádný vliv na změny chování pokusných zvířat. Stejně jako v našich předchozích studiích, vyšší dávka JMV2959 (6 mg / kg) způsobila dočasné změny v chování (pohyby podobné protahování) u méně než 40% potkanů, které byly zcela eliminovány zvukem nebo dotykem a spontánně zmizely během 20 minut po podání. JMV2959 byl podáván intraperitoneálně (i.p.) 0,1 ml / 100 g tělesné hmotnosti a vždy 20 minut před testováním CPP nebo před injekcí morfinu, nebo fyziologického roztoku. Veškeré použité látky byly analytické kvality.



**Obrázek č. 4**

Přehled struktury molekuly látky JMV2959 (převzato ze stránek [www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com))

### 3.3 In vivo CNS mikrodialýza

#### 3.3.1 Akutní experiment

V našich experimentech, kde byl ověřován vliv antagonisty ghrelinu (JMV2959) na akutní účinek podaného morfinu, byl morfin podáván v dávkách 5 nebo 10 mg / kg s.c., dávky morfinu byly zvoleny v souladu s literaturou (Mackey & van der Kooy 1985, Mucha & Herz 1986). Látka JMV2959 byla podávána i.p. vždy 20 minut před injekcí morfinu, a nebo fyziologického roztoku.

Dávka ghrelinu 40 µg / kg i.p., kterou jsme ve vybraných pokusech aplikovali současně s antagonistou GHS-R1A pro doložení zúčastněných mechanismů, je

standardní dávkou, jež zvyšuje příjem potravy (Arnold et al 2006, Quarta et al 2009), což bylo také potvrzeno v naší pilotní studii s potkany kmene Wistar.

### **3.3.2 Experiment u potkanů senzitivizovaných opakovaným podáváním morfinu („sub-chronický experiment“)**

K ověření účinku antagonismu ghrelinu na morfinem-indukovanou dopaminergní senzitivizaci v nucleus accumbens a souběžnou behaviorální senzitivizaci byl morfin nejprve aplikován jedenkrát denně po dobu pěti po sobě následujících dní ve zvyšujících se dávkách (10, 20, 20, 40, 40 mg / kg s.c.), s následným obdobím abstinence. Zvířata byla umístěna po dvojicích v boxech o stejné velikosti, jako byly boxy experimentální. 10. den abstinence byla potkanům implantována vodící kanyla pro mikrodialýzu do oblasti NAC. 12. den abstinence, kdy byla provedena *in vivo* mikrodialýza, byla zvířatům vsunuta do vodičů semipermeabilní mikrodialyzační kanyla a podána provokační dávka morfinu (5 mg / kg s.c.), nebo fyziologický roztok (s.c.). V obou případech podání předcházela premedikace JMV2959 (3 nebo 6 mg / kg i.p.), nebo fyziologického roztoku (i.p.).

### **3.3.3 Implantace dialyzační kanyly a testované skupiny zvířat**

Skupiny zvířat v akutní studii: fyziologický roztok + fyziologický roztok; fyziologický roztok + morfin 5 nebo 10 mg / kg; JMV2959 3 nebo 6 mg / kg + fyziologický roztok; JMV2959 3 nebo 6 mg / kg + morfin 5 nebo 10 mg / kg; JMV2959 3 mg / kg společně s podáním ghrelinu 40 µg / kg + morfinu 5 mg / kg.

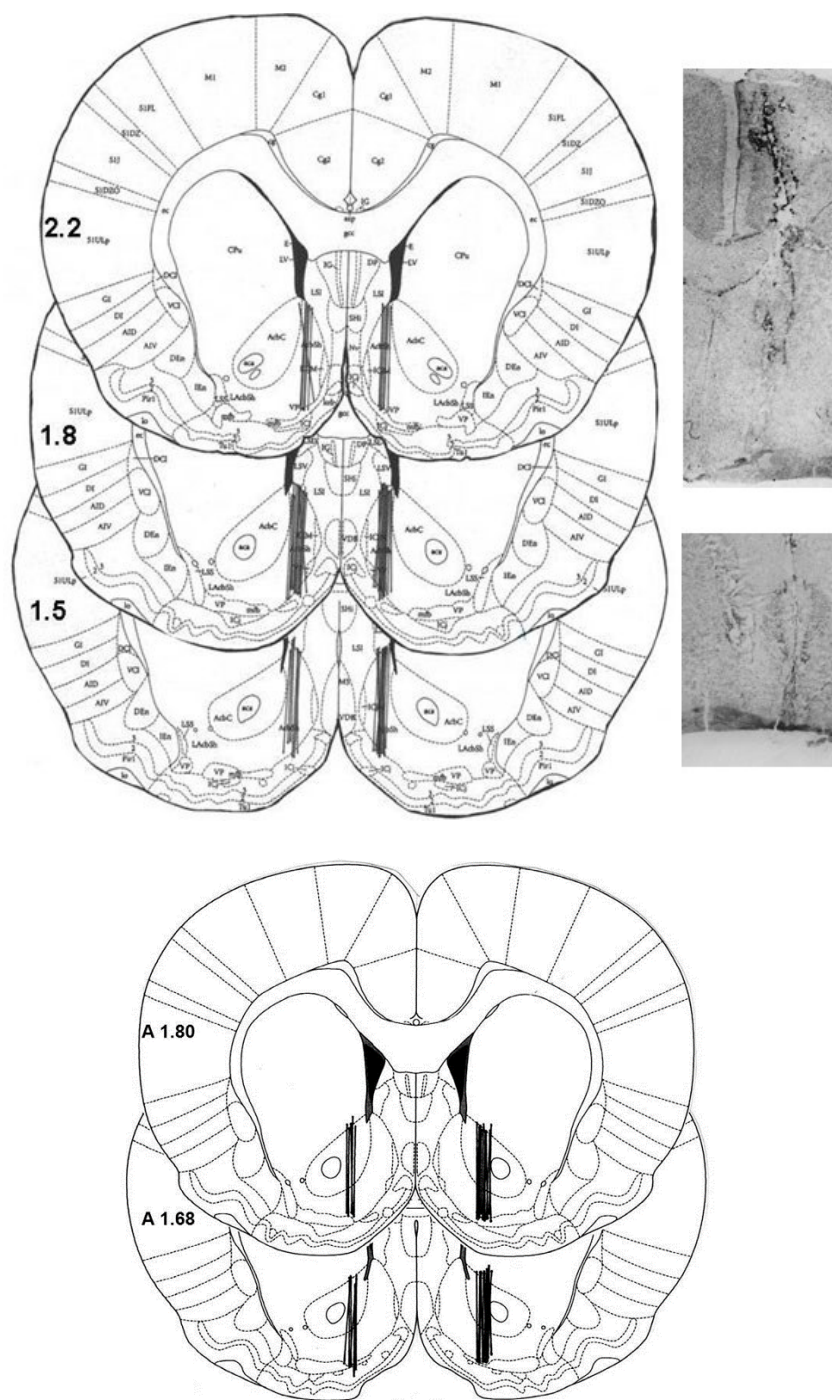
Skupiny chronicky senzibilizované morfinem během dialýzy: u vybrané skupiny zvířat byl předem podáván (pět po sobě následujících dní) fyziologický roztok, takže výše uvedená aplikace morfinu nebo fyziologického roztoku znázornila akutní účinek morfinu / fyz. roztoku. U všech ostatních skupin byl předem opakovaně podáván morfin (pět dní: 10, 20, 20, 40, 40 mg / kg s.c.). Po ukončení sub-chronické aplikace vždy následovala jedenáctidenní abstinence. Ve 12. den abstinence byly skupinám

zvířat aplikovány: fyziologický roztok + fyziologický roztok; fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg; JMV2959 3 nebo 6 mg / kg + fyziologický roztok; JMV2959 3 nebo 6 mg / kg + morfin 5 mg / kg.

Pro implantaci dialyzační kanyly byly vybrány souřadnice zahrnující slupku (shell) NAC, nebo u sub-chronického pokusu obě substrukтуры – jádro i slupku NAC (core / shell), protože opioidní senzitivizace je spojována s dopaminergní hypersenzitivitou přednostně v NAC core (Cadoni & Di Chiara 1999, Di Chiara 2002).

Implantace dialyzační kanyly byla vždy prováděna v ketamin-xylozinové anestézii (ketamin 100 mg / kg i.p., Narketan, Vetoquinol; xylozin 10 mg / kg i.p., Xylapan,

Vetoquinol), potkanům byla implantovaná jednorázová dialyzační vodící kanyla (sondy MAB4, Agnathos, Švédsko) za použití stereotaktického přístroje (StoeltingCo) do NACSh (A: + 2,0 mm a L: ± 1,2 mm od bregmatu a V: 6,2 mm od okcipitální kosti) nebo NACShe/core {A: + 1,7 mm, L: ± 1,5 mm (Paxinos 2006)} a zajištěna na lebce zubním cementem a kotevním šroubem. Pozice implantace vodící kanyly byla náhodně střídána vlevo a vpravo od osy lebky. Po operaci byly potkani uloženi jednotlivě do plastových boxů. Po dokončení všech mikrodialyzačních experimentů byla provedena evaluace umístění kanyly v CNS histologicky. Pouze zvířata se správně zavedenou dialyzační kanylou byla použita pro následnou statistickou analýzu. Ukázky implantací do NACSh (akutní experimenty) a do NACShell / Core (sub-chronické experimenty) jsou uvedeny níže (viz Obrázek č. 5) spolu s doplňujícími mikrosnímky (NACSh).



**Obrázek č. 5:**

Umístění dialyzačních sond v nucleus accumbens shell (nahore) a do nucleus accumbens core / shell (dole). Schématické umístění špiček sondy u mikrodialyzovaných potkanů (tučné svislé čáry označují dialyzační oblasti), užita schémata dle atlasu Paxinos a Watson (Paxinos 2006). Vlevo je pro každou sekci vyznačena vzdálenost od bregmatu (v mm).

### 3.3.4 Průběh mikrodialýzy

48 hodin po implantaci byla sonda (MAB4, 2 mm aktivní cuprophanová membrána, Agnathos, Švédsko) vložena do vodící kanyly a proplachována umělou cerebrospinální tekutinou (ACSF, Ringerův roztok; 147 mM NaCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub> a 4,0 mM KCl; pH 7,0) konstantní rychlostí 2,0 ml / min (Univentor 864 Syringe Pump, Agnathos, Švédsko). Po minimálně 40 minutách habituace pokusného zvířete na nové prostředí pokusné klece (dialyzát byl vyřazen), byly 20 µl vzorky odebírány ve dvacetiminutových půlených intervalech do polyethylenových mikrozkušavek obsahujících 7 ml HCl 0,1 mM, pro zabránění hydrolýzy katecholaminů. První část 20 µl dialyzátu byla jímána do slabě okyseleného prostředí (0.01 mM HCl) pro detekci monoaminů a metabolitů, druhá 20 µl část dialyzátu odebraná bez okyselení prostředí byla použita k detekci ostatních neurotransmiterů.

Po třech dvacetiminutových „baseline“ vzorcích byl potkanům podán fyziologický roztok nebo JMV2959 (obě i.p.), a o dalších 20 min později následovalo podání morfinu, nebo fyziologického roztoku (v samostatných experimentech, obě látky s.c.). Poté byly vzorky odebírány po dobu dalších 180 minut, počítáno od injekce morfinu, nebo fyziologického roztoku. Bezprostředně po odběru byl každý mikrodialyzát zmrazen na teplotu -70° C.

### 3.3.5 Stanovení koncentrace dopaminu, jeho metabolitů a endokanabinoidů

Mikrodialyzační vzorky byly odebírány v dvacetiminutových intervalech po celkovou dobu experimentu, 260 minut. V dialyzátech byla ve spolupráci s pracovištěm Laboratoře pro lékařskou diagnostiku Ústavu organické technologie VŠCHT stanovena koncentrace dopaminu a jeho metabolitů 3-metoxytyraminu (3-MT), 3,4-dihydroxyfenyloctové kys. (DOPAC) a homovanilové kys. (HVA) a dále pak endokanabinoidů anandamidu (AEA) a 2-arachidonylglycerolu (2-AG) pomocí vysoce citlivé kapalinové chromatografie kombinované s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS). Podrobnosti jsou vždy uvedeny v příložených publikacích.

### 3.4 Monitorování změn chování v průběhu in vivo mikrodialýzy

Během mikrodialyzačních měření byly souběžně u stejných zvířat pozorovány změny v jejich chování. Byly rozlišeny následující kategorie chování: **nehybnost (imobilita)** (sedace, zavřené oči, akinezie a snížená citlivost na podněty prostředí), **katalepsie** (zmrzlé postoje, exoftalmus, a rigidita trupu), **lokomoce** (nestereotypní činnost, očichávání, grooming, rearing a chůze), **stereotypní chování (stereotypie)** (ohlodávání, olizování a stereotypní očichávání) a **další příznaky** (protahování), již popsané a pozorované v recentních, ale i starších pracech (Acquas & Di Chiara 1992, Fiserova et al 1999, Rada et al 1991, Sustkova-Fiserova et al 2014). Kategorie chování byly skórovány každých 20 minut (v průběhu každého intervalu odběru vzorku) pozorovatelem neznalým schématu podání látek pokusným zvířatům. Behaviorální změny byly sledovány po celou dobu dialýzy (60 min. baseline, 20 min. před podáním látky a 180 min. po podání morfinu, nebo fyziologického roztoku). Buď jsme vypočítávali procenta času, který strávila jednotlivá zvířata v každé z kategorií chování pro každý dvacetiminutový interval, nebo byla intenzita či výskyt příslušných změn v parametrech chování spojených s každým dvacetiminutovým intervalem (výskyt parametrů během celého dvacetiminutového intervalu) hodnocena za použití předem definovaných bodů na čtyřbodové stupnici: 0 = žádný výskyt (0 výskytů), 1 = mírné (1-5 výskytů), 2 = střední (6-10 výskytů) a 3 = vysoké (více než 11 výskytů).

### 3.5 Monitorování morfinem podmíněné preference místa (CPP)

K posouzení ovlivnění GHS-R1A na odměňující, resp. posilovací vlastnosti morfinu byla použita bias (zatížená, kalibrovaná) metoda podmíněné preference místa (CPP) u potkanů (Sanchis-Segura) (Jerlhag et al 2010, Spanagel et al 1993). V tomto experimentu byl použit trojkomorový přístroj s výrazným vizuálním a hmatovým rozlišením vnějších komor. Jedna vnější část byla definována širokými vodorovnými černobílými pruhy s hrubým roštem, zatímco druhá měla mnohem jemnější rošt a byla dekorována vertikálními černo-bíle prokládanými pruhy. Středový prostor neměl žádné



zvláštní vlastnosti. Brány mezi komorami byly otevíratelné, aby byl zvířeti umožněn volný průchod mezi nimi. Všechna oddělení byla osvětlena 45 luxy. Postup sestával z počátečního testu **spontánní preference před podmiňováním** (1. den), **fáze osmi dnů podmiňování** (2. až 9. den) a **vlastního testu navozené preference místa** (10. den). První den ("pre-conditioning") byl podán každému zvířeti fyziologický roztok i.p. 20 minut před testováním. Poté bylo zvíře umístěno do středového prostoru s otevřenými branami a spontánní preference jednoho z krajních boxů byla určena během dalších 20 minut. Důvodem bylo určení "méně preferované" komory pro každého potkana. Podmiňování („conditioning“) bylo prováděno pomocí opakovaného postupu, ve kterém byla aplikace morfinu párována s pobytem v „méně preferované“ komoře. Každému pokusnému zvířeti byly vždy podány dvě injekce za den ve schématu, kde morfin 10 mg / kg s.c. byl podáván ráno a fyziologický roztok odpoledne, nebo naopak. Po injekci bylo zvíře umístěno do jedné z komor (na dobu 40 minut se zavřenou vstupní branou). V 10. den ("post-conditioning") byla experimentální zvířata umístěna do středového prostoru (s otevřenými branami) a byl jim poté na 20 minut ponechán volný přístup do obou komor. Dvacet minut před začátkem 10. dne experimentu byl každému zvířeti podán JMV2959 (3 nebo 6 mg / kg i.p.), nebo fyziologický roztok (i.p.). Bylo již dříve ověřeno, že aplikace samotného fyziologického roztoku nevyvolává žádnou změnu preferencí během CPP. Také bylo již v minulosti popsáno, že JMV2959 nemá žádný účinek per se na CPP (Jerlhag et al 2009). Proto byly tyto typy experimentů vynechány. Výsledná preference pro morfinem podmiňovaný prostor (CPP) byla vypočítána jako rozdíl v procentech z celkového součtu času stráveného v experimentální komoře (20 min) spárované s podáním morfinu (tj. méně preferovaná) během fáze před a po podmiňování.

### **3.6 Monitorování spontánní aktivity (Open field - EthoVision)**

Pro monitorování spontánní aktivity po podání JMV2959 (1, 3, nebo 6 mg / kg i.p. nebo fyziologického roztoku) na chování pokusných zvířat byl 25 minut po podání

láték použit test Open field (Ethovision). Potkan byl umístěn do standardní čtvercové arény s otevřenou plochou (Ugo Basile) a spontánní explorační lokomotorické chování bylo sledováno po dobu dvaceti minut. Na konci každého jednotlivého testu bylo zvíře vyjmuto z arény a byla vyčištěna a vysušena podlaha před umístěním zvířete dalšího. Aktivita byla zaznamenávána digitální kamerou, umístěnou nad arénou a videosignál byl transformován na signál rozpoznatelný PC softwarem (Noldus EthoVision; Noldus Information Technology, Nizozemsko). Tento software je schopný rozpoznat a uložit pohyb zvířete pomocí souřadnic x a y. Uběhnutá vzdálenost, rychlost a čas strávený ve středu arény (centrální zóně) byl počítán v rámci dvou následných desetiminutových intervalů a celkového dvacetiminutového intervalu. Rychlost videosledování byla 10 snímků za sekundu s rozlišením asi 0,8 cm. Účinky skupiny, které byl podáván JMV2959 byly porovnávány se skupinou, které byl podáván fyziologický roztok. V obou skupinách N = 9.

### **3.7 Statistická analýza**

Výsledné koncentrace dopaminu a jeho metabolitů (vyjádřené v jednotkách pikogram na mililitr na vzorek) a endokanabinoidů (vyjádřené v jednotkách nanogram na mililitr na vzorek) a které nebyly kalibrovány na obnovení sondy (recovery), byly přepočítány na procenta výchozích hodnot – baseline (průměr ze tří bazálních hodnot před podáním experimentální látky). Rovněž byly analyzovány změny v parametrech chování během dvacetiminutových intervalů. Neurochemická a behaviorální data byla statisticky analyzována pomocí software SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc.; USA). Pro výpočet statistických rozdílů mezi skupinami podávaných látek (JMV2959 + morfin, fyziologický roztok + morfin a fyziologický roztok + fyziologický roztok) v experimentech týkajících se průběžných změn během mikrodialýzy, byla použita dvoucestná, případně jednocestná analýza rozptylu pro opakované měření (analýza ANOVA RM) a následně Bonferroniho test korekce lineárních kontrastů. Rozdíly mezi baseline hodnotami z akutních a sub-chronických pokusů byly zkoumány pomocí t-

testu. Míra podmíněné preference místa (CPP) byla vypočítána jako rozdíl celkového času stráveného v méně preferovaném prostředí (komora, kde byl aplikován morfin v průběhu podmiňování) v procentech. Rozdíly mezi skupinami v CPP byly hodnoceny jednocestnou analýzou ANOVA s následným Holm-Sidakovým post-hoc testem. Data získaná z měření spontánní aktivity v otevřeném poli (Ethovision), porovnání tří skupin, kterým bylo podáváno JMV2959 oproti skupině, které byl podáván fyziologický roztok během dvou po sobě jdoucích desetiminutových intervalů pomocí dvoucestné analýzy ANOVA RM a v rámci celkového dvacetiminutového intervalu pomocí jednocestné analýzy ANOVA. Všechny statistické testy byly vyhodnoceny na hladině významnosti 0,05 (hodnoty  $P < 0,05$ ;  $< 0,01$  a  $< 0,001$  definovaly statistickou významnost). Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM. Statistické hodnoty „F“ nejsou v předkládané disertační práci uváděny ale jsou dohledatelné v citovaných publikacích, jejichž plné znění je rovněž přílohou. Pro zvýšení přehlednosti uvádím v textu pouze hodnoty „P“.

## 4. Výsledky

V následující části jsou přehledně prezentována data, která byla publikována v odborných časopisech a na kterých jsem se podílel buď jako hlavní autor nebo spoluautor. Jedná se o výsledky výzkumné práce (viz přílohy), které byly prezentovány jako (řazeno chronologicky):

Sustkova-Fiserova M, **Jerabek P**, Havlickova T, Kacer P, Krsiak M. 2014. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced accumbens dopamine release and behavioral stimulation in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 231: 2899-908

Sustkova-Fiserova M, **Jerabek P**, Havlickova T, Syslova K, Kacer P. 2016. Ghrelin and endocannabinoids participation in morphine-induced effects in the rat nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 233: 469-84

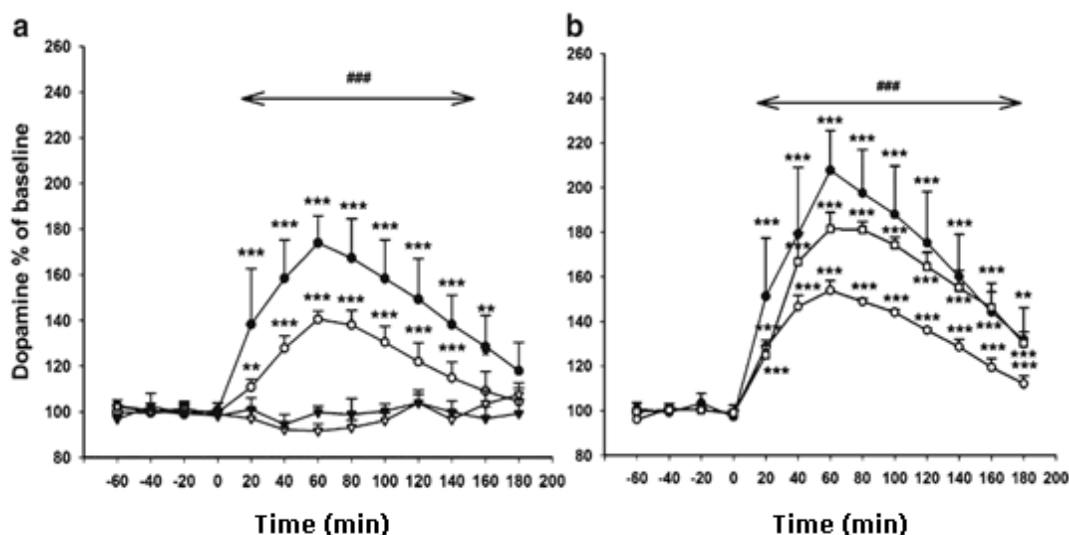
**Jerabek P**, et al., 2017. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced conditioned place preference and behavioral and accumbens dopaminergic sensitization in rats. *Neurochem Int.* 110: p. 101-113.

#### **4.1 Účinky antagonisty GHS-R1A na akutním morfinem vyvolané vyplavení dopaminu v nucleus accumbens (Sustkova-Fiserova et al 2014)**

Vliv ghrelinového antagonismu na akutním morfinem indukované uvolnění dopaminu v nucleus accumbens je znázorněn na Obrázku č. 6 (a, b). Výchozí bazální hladiny dopaminu se mezi jednotlivými zvířaty významně nelišily. V souladu s očekáváním, vyvolalo podání morfinu u potkanů statisticky významný, na dávce závislý, nárůst uvolňování dopaminu v NACSh. Nižší dávka morfinu (5 mg / kg s.c.) byla významně účinná s maximem uvolnění dopaminu 60 min po podání (174% výchozí hodnoty) (fyziologický roztok + MO 5 mg / kg,  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM následovaná Bonferroniho testem oproti baseline). Efekt vyšší dávky morfinu (10 mg / kg s.c.) dosáhl svého maxima opět 60 min po podání (208% výchozí hodnoty) (fyziologický roztok + MO 10 mg / kg;  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM následovaná Bonferroniho testem oproti baseline).

Premedikace antagonistou receptoru GHS-R1A, látkou JMV2959 (6 mg / kg i.p.) snížila morfinem (5 mg / kg s.c.) indukované zvýšení hladiny dopaminu ze 174% na 140% základní hodnoty, což představuje snížení významné ( $P < 0,05$ ; dvoucestná ANOVA a Tukeyův test); avšak zvýšení dopaminu, indukované morfinem zůstalo stále za hranicí významnosti (JMV2959 + MO 5 mg / kg;  $P < 0,001$ , jednocestná ANOVA RM následovaná Bonferroniho testem oproti baseline). Po podání vyšší dávky morfinu (10 mg / kg s.c.), premedikace antagonistou JMV2959 (6 mg / kg i.p.) snížila morfinem indukované zvýšení hladiny dopaminu z výchozí hodnoty 208% na 154% ( $P < 0,001$ ; dvoucestná ANOVA, Tukey); také zde zvýšení dopaminu vyvolané podáním morfinu zůstalo významné (JMV2959 6 mg / kg + MO 10 mg / kg;  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni). Premedikace JMV2959 (3 mg / kg i.p.) lehce, ale ne

významně snížila morfinem 10 mg / kg s.c. indukované zvýšení dopaminu; významné opět zůstalo zvýšení hladiny dopaminu (JMV2959 3 mg / kg + MO 10 mg / kg;  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni). Dávka samotné látky JMV2959 (6 mg / kg i.p.) nijak neovlivnila hodnotu hladiny dopaminu v NACSh; totéž platilo i pro podání fyziologického roztoku.



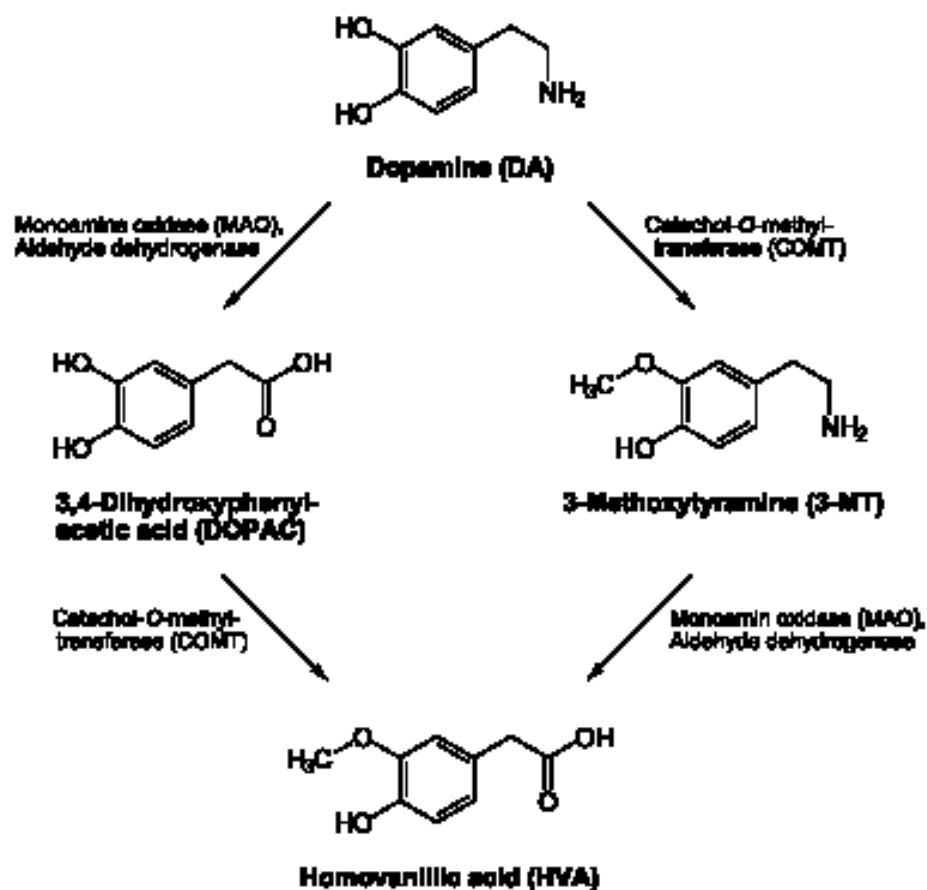
**Obrázek č. 6** (Sustkova-Fiserova et al 2014)

Účinky antagonisty ghrelinového receptoru (GHS-R1A), látky JMV2959 na morfinem indukované uvolňování dopaminu v NACSh. JMV2959 byl vždy podáván i.p. 20 min před morfinem / fyziologickým roztokem (s.c.) ( $n = 6$  pro všechny skupiny, průměr  $\pm$  SEM). Účinky jsou znázorněny následovně: a) fyziologický roztok + MO 5 mg / kg (plný kruh), JMV2959 6 mg / kg + MO 5 mg / kg (prázdný kruh), JMV2959 6 mg / kg + fyziologický roztok (prázdný trojúhelník), fyziologický roztok + fyziologický roztok (plný trojúhelník). b) fyziologický roztok + MO 10 mg / kg (plný kruh), JMV2959 6 mg / kg + MO 10 mg / kg (prázdný kruh), JMV2959 3 mg / kg + MO 10 mg / kg (prázdný čtverec). Rozdíly mezi podáním látek a průměrem baseline jsou vyjádřeny jako \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$ ; rozdíly mezi jednotlivým podáním morfinu vůči JMV2959 6 mg / kg s účinkem premedikace morfinem jsou vyjádřeny jako ###  $P < 0,001$ . (U premedikace dávkou 3 mg/kg JMV2959, nebyly rozdíly mezi morfinem a JMV2959 3 mg / kg + MO statisticky významné.)

## 4.2 Účinky premedikace antagonistou GHS-R1A na akutním morfinem zvýšené koncentrace metabolitů dopaminu v nucleus accumbens (Sustkova-Fiserova et al 2014)

Přehled metabolitů dopaminu je znázorněn na Obrázku č. 7. Vliv ghrelinového antagonismu na akutní, morfinem indukovaný, dopaminový metabolismus (měřeno v

NACSh) je znázorněn na Obrázku č. 8 (a až f). Jak jsme očekávali, zjistili jsme významné, na dávce závislé, zvýšení hladin DOPAC, 3-MT a HVA po podání obou dávek morfinu. Účinky premedikace JMV2959 byly různé; nicméně metabolismus cestou MAO a celkový metabolismus dopaminu (koncentrace HVA) v NACSh byly přechodně významně zvýšeny.



Obrázek č. 7

Přehled metabolických drah a metabolitů dopaminu.

#### 4.2.1 3-MT

U metabolitu 3-MT (viz Obrázek č. 8 a, b) vyvolalo podání nižší dávky morfinu významné zvýšení jeho hladiny s vrcholem 60 min po injekci morfinu. (137% výchozí hodnoty) (fyziologický roztok + MO 5 mg / kg;  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni). Vyšší dávka morfinu vyvolala významné zvýšení hladiny 3-MT

s vrcholem rovněž 60 minut po injekci morfinu (147% výchozí hodnoty) (fyziologický roztok + MO 10 mg / kg;  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni).

Premedikace JMV2959 (6 mg / kg i.p.) významně snížila zvýšení koncentrace 3-MT (v NACSh), spojené s dávkou morfinu (5 mg / kg s.c.) ( $P < 0,05$ ; dvoucestná ANOVA, Tukey). Maximální účinek byl zaznamenán 80 minut po podání morfinu a maximální pokles byl pozorován na 123% výchozí hodnoty; zvýšení hladiny 3-MT zůstalo stále významné (JMV2959 + MO 5 mg / kg;  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni). Při dávce morfinu 10 mg / kg, obě dávky JMV2959 (3 a 6 mg / kg) významně neovlivnily morfinem indukované zvýšení hladiny 3-MT. Účinky dávky morfinu 10 mg / kg zůstaly v tomto případě téměř stejné, jako v případě, kdy nebyla podána premedikace JMV2959. Dávka samotné látky JMV2959 (6 mg / kg i.p.) nijak neovlivnila hodnotu hladiny 3-MT v NACSh; totéž platilo i pro podání fyziologického roztoku.

#### **4.2.2 DOPAC**

Účinek antagonisty GHS-R1A na morfinem indukované zvýšení hladiny DOPAC v NACSh je znázorněn na Obrázku č. 8 (c, d). Nižší dávka morfinu zde indukovala významné zvýšení DOPAC s vrcholem účinku 60 minut po podání morfinu (127% výchozí hodnoty) (fyziologický roztok + MO 5 mg / kg;  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni). Vyšší dávka morfinu rovněž vyvolala významné zvýšení hladiny DOPAC s vrcholem 80 minut po injekci morfinu (131% výchozí hodnoty) (fyziologický roztok + MO 10 mg / kg;  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni).

Premedikace JMV2959 významně neovlivnila morfinem (5 mg / kg s.c.) indukované zvýšení hladiny DOPAC. Nicméně premedikace antagonistou JMV2959 významně zesílila morfinem (10 mg / kg) indukované zvýšení hladiny DOPAC (JMV2959 v koncentraci 6 mg / kg,  $P < 0,001$ ; JMV2959 v koncentraci 3 mg / kg,  $P < 0,01$ ; dvoucestná ANOVA, Tukey). Po premedikaci látkou JMV2959 (6 mg / kg i.p.) se zvýšila koncentrace DOPAC na maximální hodnotu 153% hodnoty výchozí, 60 min

po podání morfinu (JMV2959 6 mg / kg + MO 10 mg / kg,  $P < 0,001$ , jednocestná ANOVA RM, Bonferroni). Po premedikaci látkou JMV2959 (3 mg / kg i.p.) se zvýšila koncentrace DOPAC na maximální hodnotu 141% výchozí hodnoty v čase 80 min po podání morfinu (JMV2959 3 mg / kg + MO 10 mg / kg,  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni). Samotná dávka JMV2959 (6 mg / kg i.p.) lehce (dočasně významně) zesílila zvýšení DOPAC na maximální hodnotu 108% výchozí hodnoty v čase 60 min po jejím podání (JMV2959 + fyz. roztok,  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni). Podání fyziologického roztoku nijak neovlivnilo koncentraci DOPAC.

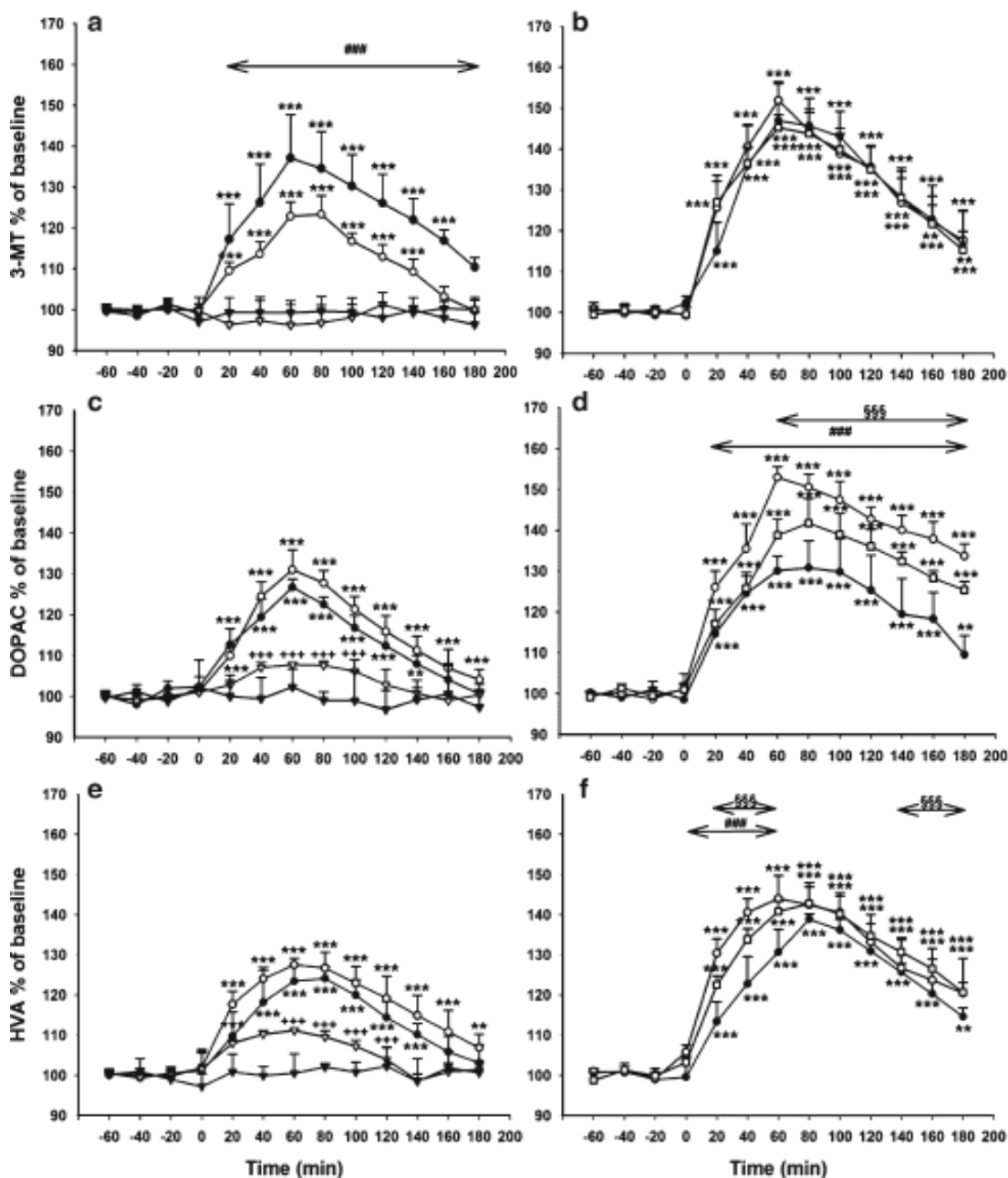
#### 4.2.3 HVA

Účinek antagonisty GHS-R1A na morfinem vyvolané zvýšení hladiny HVA (v NACSh) je znázorněn na Obrázku č. 8 (e, f). Nižší dávka morfinu indukovala významné zvýšení HVA s vrcholem účinku 80 minut po podání morfinu (124% výchozí hodnoty) (fyziologický roztok + MO 5 mg / kg,  $P < 0,001$ , jednocestná ANOVA RM; Bonferroni). Vyšší dávka morfinu vyvolala významný účinek s vrcholem zvýšení koncentrace HVA v čase 80 minut po podání morfinu (139% výchozí hodnoty) (fyziologický roztok + MO 10 mg / kg,  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni).

Premedikace JMV2959 (6 mg / kg i.p.) významně neovlivnila morfinem (5 mg / kg s.c.) indukované zvýšení hladiny HVA a pozorovaný nárůst zůstal významný, s vrcholem účinku 60 minut po podání morfinu (127% výchozí hodnoty) (JMV2959 + MO 5 mg / kg,  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni). Premedikace antagonistou JMV2959 (6 mg / kg i.p.) dočasně významně zesílila morfinem (10 mg / kg s.c.) indukované zvýšení hladiny HVA ( $P < 0,001$ ; dvoucestná ANOVA, Tukey). Maximální účinek se zvýšil na 144% výchozí hodnoty (60 min po aplikaci morfinu) (JMV2959 6 mg / kg + MO 10 mg / kg,  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni). Také premedikace nižší dávkou JMV2959 (3 mg / kg i.p.) dočasně zesílila morfinem (10 mg / kg s.c.) indukované zvýšení hladiny HVA ( $P < 0,05$ ; dvoucestná ANOVA, Tukey) s maximálním zvýšením na 141% výchozí hodnoty (80 minut po



podání morfinu) (JMV2959 3 mg / kg + MO 10 mg / kg,  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni). Dávka samotné látky JMV2959 (6 mg / kg i.p.) mírně (dočasně významně) zvýšila koncentraci HVA, na maximální hodnotu 111% výchozí hodnoty (JMV2959 + fyziologický roztok,  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroni). Podání fyziologického roztoku nijak neovlivnilo koncentraci HVA.



**Obrázek č. 8** (Sustkova-Fiserova et al 2014)

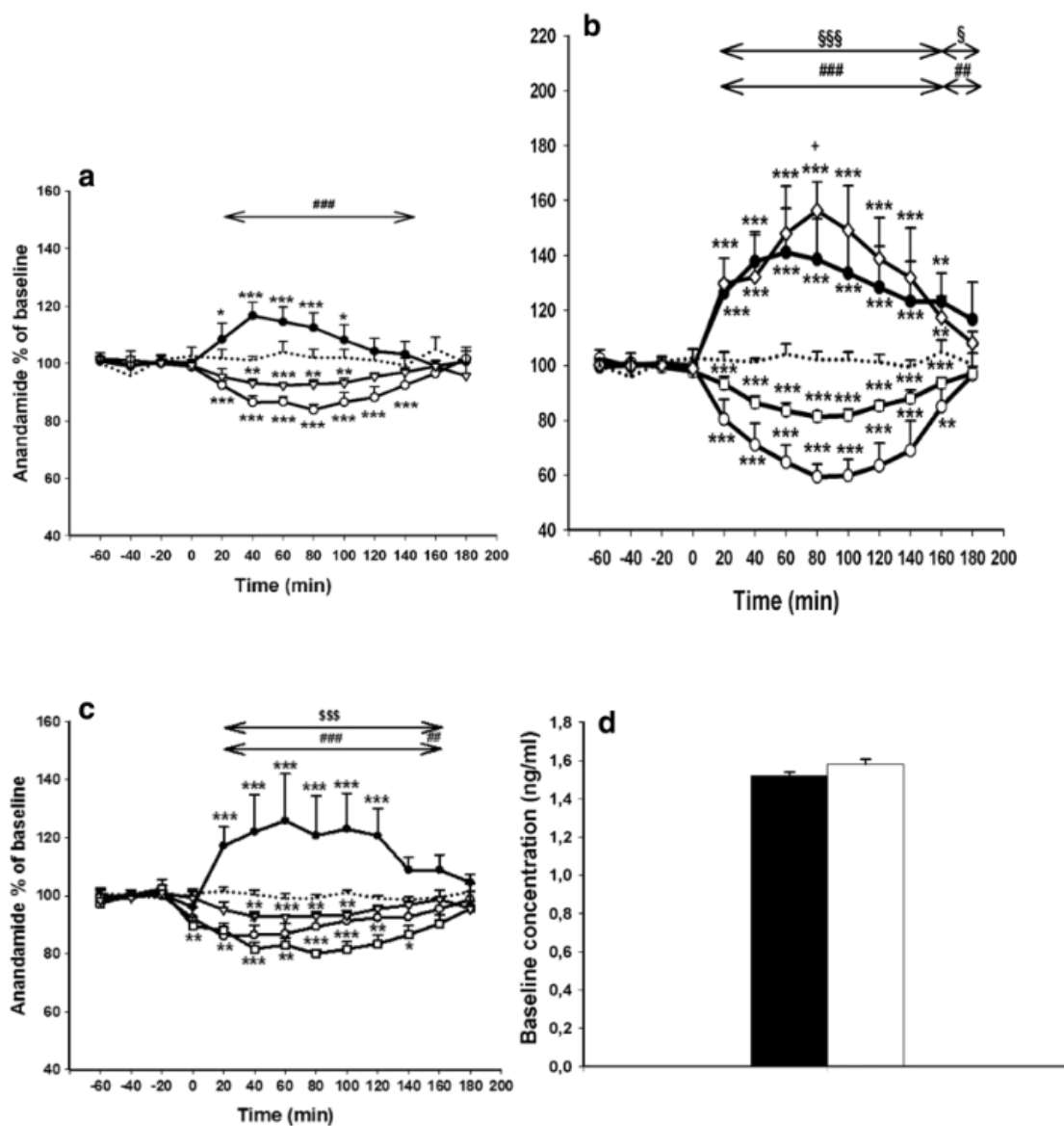
Účinky antagonisty ghrelinového receptoru GHS-R1A (JMV2959) na změny koncentrací dopaminových metabolitů (3-MT, DOPAC a HVA) v NACSh po akutním podání dávky morfinu s.c. potkanům (n=6 pro všechny skupiny, průměry  $\pm$  SEM). JMV2959 byl vždy podáván i.p. 20 min. před morfinem / fyz. roztokem (s.c.). Účinky na metabolity jsou zobrazeny v tomto pořadí **a** účinek na 3-MT: fyz. roztok + MO 5 mg/kg (plný kruh), JMV2959 6 mg/kg + MO 5 mg/kg (prázdný kruh), JMV2959 6 mg/kg + fyz. roztok (prázdný trojúhelník), fyz. roztok + fyz. roztok (plný trojúhelník); **b** účinek na 3-MT: fyz. roztok + MO 10 mg/kg (plný kruh), JMV2959 6 mg/kg + MO 10 mg/kg (prázdný kruh), JMV2959 3 mg/kg + MO 10 mg/kg (prázdný čtverec); **c** účinek na DOPAC: fyz. roztok + MO 5 mg/kg (plný kruh), JMV2959 6 mg/kg + MO 5 mg/kg (prázdný kruh), JMV2959 6 mg/kg + fyz. roztok (prázdný trojúhelník), fyz. roztok + fyz. roztok (plný trojúhelník); **d** účinek na DOPAC: fyz. roztok + MO 10 mg/kg (plný kruh), JMV2959 6 mg/kg + MO 10 mg/kg (prázdný kruh), JMV2959 3 mg/kg + MO 10 mg/kg (prázdný čtverec); **e** účinek na HVA: fyz. roztok + MO 5 mg/kg (plný kruh), JMV2959 6 mg/kg + MO 5 mg/kg (prázdný kruh), JMV2959 6 mg/kg + fyz. roztok (prázdný trojúhelník), fyz. roztok + fyz. roztok (plný trojúhelník); **f** účinek na HVA: fyz. roztok + MO 10 mg/kg (plný kruh), JMV2959 6 mg/kg + MO 10 mg/kg (prázdný kruh), JMV2959 3 mg/kg + MO 10 mg/kg (prázdný čtverec). Rozdíly efektů podáných látek vůči baseline jsou vyjádřeny jako \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$ , nebo +++  $P < 0,001$ , ++  $P < 0,01$ . Rozdíly mezi podáním morfinu s fyziologickým roztokem vůči premedikaci JMV2959 6 mg/kg před podáním morfinu nebo morfinu s fyziologickým roztokem vůči premedikaci JMV2959 3 mg/kg před podáním morfinu jsou vyjádřeny jako ###  $P < 0,001$  nebo §§§  $P < 0,001$ .

### **4.3 Účinky antagonisty GHS-R1A na morfinem indukované zvýšení extracelulární koncentrace anandamidu (AEA) v nucleus accumbens v akutním experimentu a během abstinence (Sustkova-Fiserova et al 2016)**

#### **4.3.1 Podání morfinu v akutních dávkách**

Vliv ghrelinového antagonismu na akutní, morfinem indukované, extracelulární zvýšení hladiny N-arachidonoylethanolaminu (AEA, ananamid) v NACSh je znázorněno na Obrázku č. 9 (a, b). Úrovně baseline se u AEA mezi jednotlivými zvířaty, u akutních a sub-chronických experimentů, významně nelišily (Obrázek 2d). Jak bylo předpokládáno, akutní systémové podávání morfinu indukovalo statisticky významné a na dávce závislé zvýšení hladiny AEA v NACSh. Dvoucestná analýza ANOVA pro opakovaná podání (RM) a Bonferroniho test ukázali významný účinek ve skupině: fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok ( $P = 0,002$ ) a čas ( $P < 0,001$ ); časová závislost změn v hladinách AEA v NACSh po podání fyziologického roztoku / morfinu 5 mg / kg se lišila mezi dvěma skupinami zvířat ( $P < 0,001$ ). Podání morfinu 5 mg / kg indukovalo zvýšení AEA oproti výchozí hodnotě baseline, které bylo rovněž významné ( $P < 0,001$ ), s maximem účinku 117% úrovně baseline. Vyšší dávka morfinu (10 mg / kg s.c.) vyvolala masivnější zvýšení

hladiny AEA ve srovnání s kontrolní skupinou, které byl podáván fyziologický roztok: fyziologický roztok + morfin 10 mg / kg vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok:  $P < 0.001$ ; efekt času:  $P < 0.001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0.001$ . Bylo rovněž zaznamenáno zvýšení průměru hodnot baseline uvnitř skupiny, s maximálním nárůstem účinku na 142 % úrovně baseline.



**Obrázek č. 9** (Sustkova-Fiserova et al 2016)

Účinky antagonisty GHS-R1A (JMV2959) na morfinem vyvolané uvolňování AEA v NACSh. JMV2959 byl vždy podáván i.p. 20 minut před podáním morfinu / s.c. injekce fyziologického roztoku ( $n = 6$  pro všechny skupiny s výjimkou 10 zvířat ve skupině podání fyziologického roztoku + morfinu; průměr  $\pm$  SEM). Účinky jsou zobrazeny následovně: **a** fyziologický roztok + akutní 5 mg / kg morfin (plný kruh), 6 mg / kg JMV2959 + akutní 5 mg / kg morfin (prázdný kruh), 6 mg / kg JMV2959 + akutní fyziologický roztok (prázdný trojúhelník), fyziologický roztok + akutní fyziologický roztok (tečkovaná čára); **b** fyziologický roztok + akutní 10 mg / kg morfin (plný kruh), 6 mg / kg JMV2959 + akutní 10 mg / kg morfin (prázdný kruh), 3 mg / kg JMV2959 + akutní 10 mg / kg morfin (prázdný čtverec), 3 mg / kg JMV2959 spolu s ghrelinem 40  $\mu$ g / kg + akutní 10 mg / kg (prázdný diamant), fyziologický roztok + akutní fyziologický roztok (tečkovaná čára); **c** fyziologický roztok + 5 mg / kg morfin (plný kruh), 6 mg / kg JMV2959 + 5 mg / kg morfin (prázdný kruh), 3 mg / kg JMV2959 + 10 mg / kg morfin (otevřený čtverec), 6 mg / kg JMV2959 + fyziologický roztok (otevřený trojúhelník), fyziologický roztok + fyziologický roztok (tečkovaná čára); **d** rozdíly mezi anandamidovými baselines v akutním (černý sloupec) a sub-chronickém (bílý sloupec) podání ( $P < 0,05$ , rozdíl nebyl významný). Rozdíly mezi jednotlivými podáními a průměrem baseline jsou vyjádřeny jako \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ . Rozdíly mezi morfinem a 6 mg / kg JMV2959 + morfinem nebo morfinem a 3 mg / kg JMV2959 + morfinem nebo morfinem a 3 mg / kg JMV2959 s ghrelinem + morfinové účinky jsou vyjádřeny jako ####  $P < 0,001$ , ###  $P < 0,01$ , #  $P < 0,05$  nebo §§§  $P < 0,001$ , §  $P < 0,05$  nebo +  $P < 0,05$ .

Podání antagonisty JMV2959 zvrátilo morfinem vyvolané zvýšení hladiny AEA v NACSh a naopak způsobilo statisticky významné a na dávce závislé snížení této hladiny. Podání JMV2959 6 mg / kg změnilo účinek podání samotného morfinu 5 mg / kg na AEA tak, že ze zvýšené koncentrace AEA došlo k jejímu poklesu na úroveň hodnoty 84% baseline. Tento pokles způsobený podáním JMV2959 byl vysoce statisticky významný: JMV2959 6 mg / kg + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg:  $P < 0,001$ ; vliv času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ . Navíc změny ve srovnání s hodnotami baseline v rámci skupiny JMV2959 byly statisticky významné ( $P < 0,001$ ). Podání JMV2959 v dávce 3 a 6 mg / kg v závislosti na dávce zvrátilo účinek morfinem (10 mg / kg) indukovaného zvýšení koncentrace AEA. Pro nižší dávku JMV2959: JMV2959 3 mg / kg + morfin 10 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 10 mg / kg: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ . Pro vyšší dávku: JMV2959 6 mg / kg + morfin 10 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 10 mg / kg: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ . Hladiny extracelulární AEA klesly u zvířat, kterým byla podána látka JMV2959, na 81% (dávka 3 mg / kg JMV2959) resp. 59% (dávka 6 mg / kg JMV2959) hodnot baseline.

Ghrelín 40  $\mu$ g / kg podaný současně s 3 mg / kg JMV2959 20 minut před morfinem 10 mg / kg zcela vyrušil účinky JMV2959: JMV2959 3 mg / kg společně s

ghrelinem + morfinem 10 mg / kg vs. JMV2959 3 mg / kg + morfin 10 mg / kg: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ . Kombinované podávání ghreluinu dokonce vyvolalo ještě masivnější vzestup AEA než u skupiny zvířat, kterým byl podáván fyziologický roztok + morfin 10 mg / kg, se statisticky významným rozdílem v čase 80 minut po aplikaci morfinu: JMV2959 3 mg / kg společně s ghrelinem + morfinem 10 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 10 mg / kg: efekt skupiny byl bez významnosti; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,05$ . Jednorázové podání ghreluinu 40  $\mu\text{g}$  / kg i.p. vyvolalo významné zvýšení AEA s vrcholem 194%, 60 minut po aplikaci (není zobrazeno).

Jednorázová dávka JMV2959 6 mg / kg i.p. vyvolala mírné, dočasně významné, snížení hladiny AEA na úroveň 92% baseline v čase 80 minut po její aplikaci ( $P < 0,001$  ve srovnání s průměrem baseline). JMV2959 6 mg / kg + fyziologický roztok vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času byl bez významnosti; čas vs. interakce skupiny:  $P = 0,003$ . Akutní jednorázová aplikace fyziologického roztoku neměla žádný účinek na změnu koncentrace AEA.

#### **4.3.2 Opakované podání morfinu během fáze morfinové abstinence**

Obrázek č. 9c ilustruje pozorovaný vliv ghrelinového antagonismu na změny koncentrací AEA v NACSh vyvolaných podáním dávky morfinu 5 mg / kg ve 12. den abstinence, která následovala po 5tídení aplikaci morfinu. Ve srovnání s akutním účinkem morfinu 5 mg / kg, stejná dávka morfinu, ovšem podaného ve formě provokační dávky během stavu abstinence, vyvolala zvýšení koncentrace AEA výrazně vyšší intenzity: fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + akutní morfin 5 mg / kg: efekt skupiny:  $P < 0,05$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,05$ . Morfinem vyvolané zvýšení koncentrace AEA dosáhlo maximální úrovně 126% hodnoty baseline a bylo i ve srovnání s baseline statisticky významné ( $P < 0,001$ ): fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$  ( $n = 10$ ).

Obdobně jako při akutním podání, JMV2959 3 a 6 mg / kg i.p. zvrátilo morfinem způsobené zvýšení koncentrace AEA v pokles koncentrace na 82% baseline v případě JMV2959 3 mg / kg a na 86% v případě koncentrace 6 mg / kg ( $P < 0,001$ ). Pro nižší koncentraci JMV2959: JMV2959 3 mg / kg + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,01$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ . Pro vyšší koncentraci JMV2959: JMV2959 6 mg / kg + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ .

Jednorázová dávka JMV2959 6 mg / kg i.p. během morfinové abstinence, podobně jako při akutním podání, dočasně, statisticky významně, snížila koncentraci AEA v NACSh na 93% baseline ( $P < 0,001$ ) v porovnání s průměrnou hodnotou baseline. JMV2959 6 mg / kg + fyziologický roztok vs. fyziologický roztoku + fyziologický roztok: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ . Aplikace dávky samotného fyziologického roztoku neměla vliv na koncentraci AEA v NACSh.

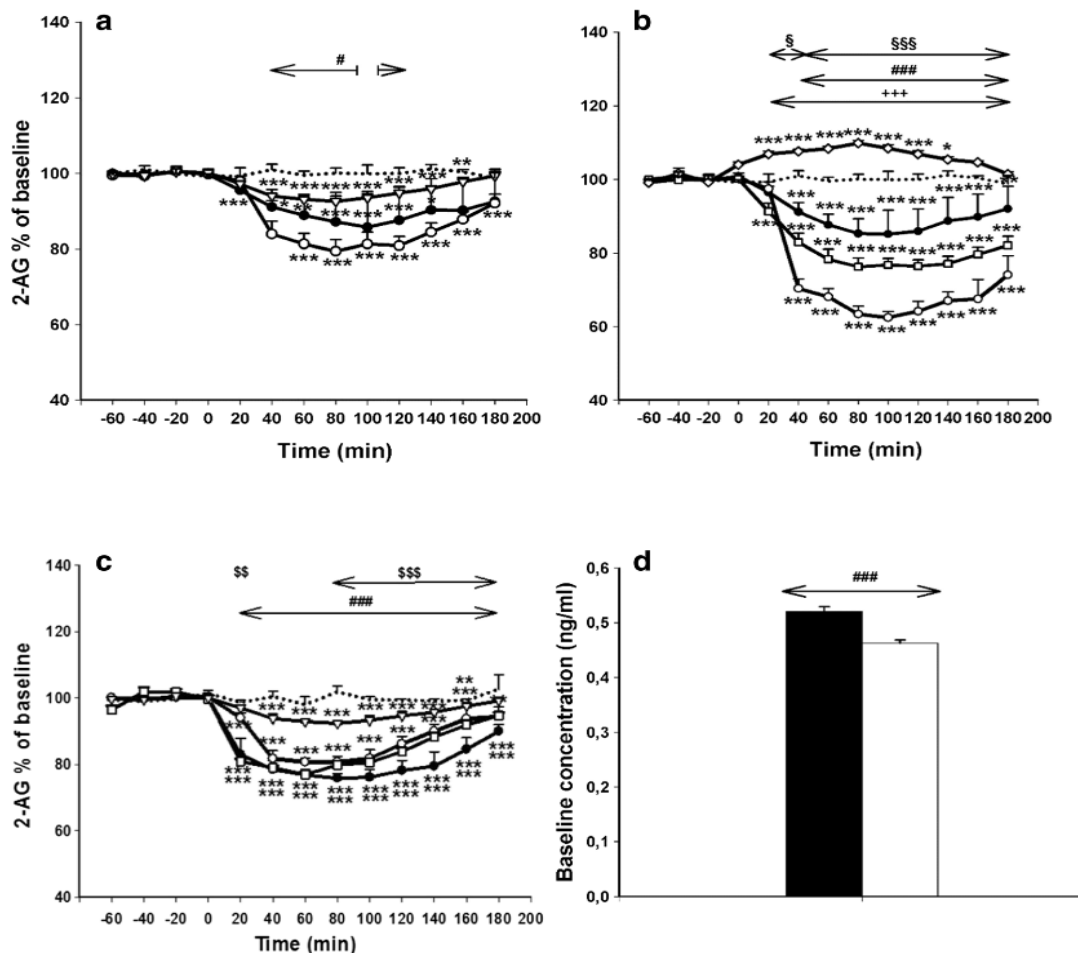
Ve srovnání baseline koncentrací AEA u akutních a sub-chronických experimentů nebyly nalezeny žádné významné odlišnosti (Obrázek č. 9d).

#### **4.4 Účinky antagonisty GHS-R1A na morfinem indukované zvýšení extracelulární koncentrace 2-arachidonylglycerolu (2-AG) v nucleus accumbens v akutním experimentu a během abstinence (Sustkova-Fiserova et al 2016)**

##### **4.4.1 Podání morfinu v akutních dávkách**

Vliv antagonismu ghrelinu na akutní, morfinem indukovaný extracelulární pokles 2-AG v NACSh je znázorněn na Obrázku č. 10 (a, b). Porovnáním baseline 2-AG nebyly zjištěny významné změny hodnot koncentrací mezi jednotlivými pokusnými zvířaty. Akutní podávání morfinu navodilo statisticky významný pokles koncentrace 2-AG v NACSh. Dvoucestná analýza ANOVA pro opakovaná měření

(RM), následovaná Bonferroniho testem, odhalila významný efekt skupiny: fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok ( $P = 0,003$ ) a čas ( $P < 0,001$ ); časový průběh změn 2-AG v NACSh po podání fyziologického roztoku / morfinu (5 mg / kg s.c.) se významně lišil mezi dvěma skupinami zvířat (čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ). Morfinem 5 mg / kg vyvolaný pokles koncentrace hladiny 2-AG v porovnání s průměrem baseline v rámci skupiny byl rovněž statisticky významný ( $P < 0,001$ ) s poklesem na 86% baseline. Vyšší dávka morfinu (10 mg / kg s.c.) vyvolala srovnatelný pokles hladiny 2-AG v NACSh v porovnání se skupinou, které byl podáván fyziologický roztok: fyziologický roztok + MO 10 mg / kg vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ; a rovněž vyvolala srovnatelný pokles průměru baseline uvnitř skupiny na 85% původní hodnoty.



**Obrázek č. 10** (Sustkova-Fiserova et al 2016)

Účinky antagonisty GHS-R1A (JMV2959) na morfinem vyvolané uvolňování 2-AG v NACSh u potkanů. JMV2959 byl vždy podáván i.p. 20 minut před podáním morfinu / s.c. injekce fyziologického roztoku (n = 6 pro všechny skupiny s výjimkou 10 zvířat ve skupině fyziologického roztoku + morfin; průměr ± SEM). Účinky jsou zobrazeny následovně: **a** fyziologický roztok + akutní 5 mg / kg morfin (plný kruh), 6 mg / kg JMV2959 + akutní 5 mg / kg morfin (prázdný kruh), 6 mg / kg JMV2959 + akutní fyziologický roztok (prázdný trojúhelník), fyziologický roztok + akutní fyziologický roztok (tečkovaná čára); **b** fyziologický roztok + akutní 10 mg / kg morfin (plný kruh), 6 mg / kg JMV2959 + akutní 10 mg / kg morfin (prázdný kruh), 3 mg / kg JMV2959 + akutní 10 mg / kg morfin (prázdný čtverec), 3 mg / kg JMV2959 spolu s ghrelinem 40 µg / kg + akutní 10 mg / kg morfin (prázdný diamant), fyziologický roztok + akutní fyziologický roztok (tečkovaná čára); **c** fyziologický roztok + 5 mg / kg morfin (plný kruh), 6 mg / kg JMV2959 + 5 mg / kg MO (prázdný kruh), 3 mg / kg JMV2959 + 10 mg / kg morfin (prázdný čtverec), 6 mg / kg JMV2959 + fyziologický roztok (prázdný trojúhelník), fyziologický roztok + fyziologický roztok (tečkovaná čára); **d** rozdíly mezi baselines 2-AG v akutním (černý sloupec) a sub-chronickém (bílý sloupec) podání (rozíl vyjádřený jako #### P < 0,001). Rozdíly mezi jednotlivými podáními a průměrem baseline jsou vyjádřeny jako \*\*\* P < 0,001, \*\* P < 0,01, \* P < 0,05. Rozdíly mezi morfinem a 6 mg / kg JMV2959 + morfin nebo morfin a 3 mg / kg JMV2959 + morfinem nebo morfinem a 3 mg / kg JMV2959 s ghrelinem + morfinové účinky jsou vyjádřeny jako ### P < 0,001 nebo §§§ P < 0,001 nebo +++ P < 0,001.



Premedikace JMV2959 závisle na dávce prohloubila pokles morfinem způsobeného snížení hladiny 2-AG v NACSh. JMV2959 v koncentraci 6 mg / kg i.p. mírně, ale statisticky významně ( $P < 0,05$ ) snížila koncentraci 2-AG, vyvolanou podáním morfinu 5 mg / kg, na 79% hodnoty baseline: JMV2959 6 mg / kg + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg: efekt skupiny byl bez statistické významnosti; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P = 0,007$ . Koncentrace 3 a 6 mg / kg antagonisty JMV2959 zesílila na dávce závislý, morfinem (10 mg / kg s.c.) vyvolaný pokles koncentrace 2-AG. Pro nižší koncentraci: JMV2959 3 mg / kg + morfin 10 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 10 mg / kg:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ . Pro vyšší koncentraci: JMV2959 6 mg / kg + morfin 10 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 10 mg / kg: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ . Koncentrace extracelulárního 2-AG poklesla ve skupině s JMV2959 v závislosti na dávce na 76% (3 mg / kg JMV2959) a 62% (6 mg / kg JMV2959) úrovně baseline.

Ghrelín 40  $\mu$ g / kg podaný současně se 3 mg / kg JMV2959 20 minut před podáním morfinu 10 mg / kg zcela vyrušil účinky látky JMV2959: JMV2959 3 mg / kg společně s ghrelinem + morfinem 10 mg / kg vs. JMV2959 3 mg / kg + morfin 10 mg / kg: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ . Současné podání ghrelu dokonce vyvolalo mírné, ale významné zvýšení koncentrace 2-AG ve srovnání s výchozím průměrem baseline, a to na 110% ( $P < 0,001$ ). Koncentrace 2-AG v NACSh byly významně odlišné u skupiny zvířat, kterým byl podáván fyziologický roztok + morfin 10 mg / kg: JMV2959 3 mg / kg společně s ghrelinem + morfinem 10 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 10 mg / kg: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ . Podaná dávka ghrelu 40  $\mu$ g / kg i.p. vyvolala významné zvýšení koncentrace 2-AG na 143% po 60 minutách po podání (není zobrazeno).

Premedikace JMV2959 6 mg / kg i.p. mírně, ale významně snížila koncentraci 2-AG na hodnotu 93% ( $P < 0,001$  ve srovnání s průměrem baseline). JMV2959 6 mg /

kg + fyziologický roztok vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ .

Aplikace dávky samotného fyziologického roztoku neměla vliv na změny v koncentraci 2-AG v NACSh.

#### **4.4.2 Opakované podání morfinu během fáze morfinové abstinence**

Obrázek č. 10c zobrazuje pozorovaný vliv ghrelinového antagonismu na změny v koncentraci 2-AG vyvolané podáním morfinu 5 mg / kg ve 12. den abstinence, jež následovala po pětidenní aplikaci morfinu. Podaná dávka morfinu 5 mg / kg s.c. vyvolala statisticky významný pokles koncentrace 2-AG na 75% úrovně baseline ( $P < 0,001$  ve srovnání s průměrem baseline;  $n = 10$ ). Fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ . Podání morfinu vyvolalo v koncentraci 2-AG pokles, který byl v sub-chronickém experimentu statisticky významně hlubší, než v experimentu akutním: fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + akutní morfin: účinek skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ .

Premedikace JMV2959 v koncentraci 3 a 6 mg / kg i.p. mírně, ale statisticky významně snížila morfinem (5 mg / kg s.c.) vyvolaný pokles koncentrace 2-AG na hodnoty 77% a 81% baseline ( $P < 0,001$ ). Pro nižší dávku JMV2959: 3 mg / kg JMV2959 + 5 mg / kg morfinu vs. fyziologický roztok + 5 mg / kg morfinu: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ . Pro vyšší dávku JMV2959: 6 mg / kg JMV2959 + 5 mg / kg morfinu vs. fyziologický roztok + 5 mg / kg morfinu: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ .

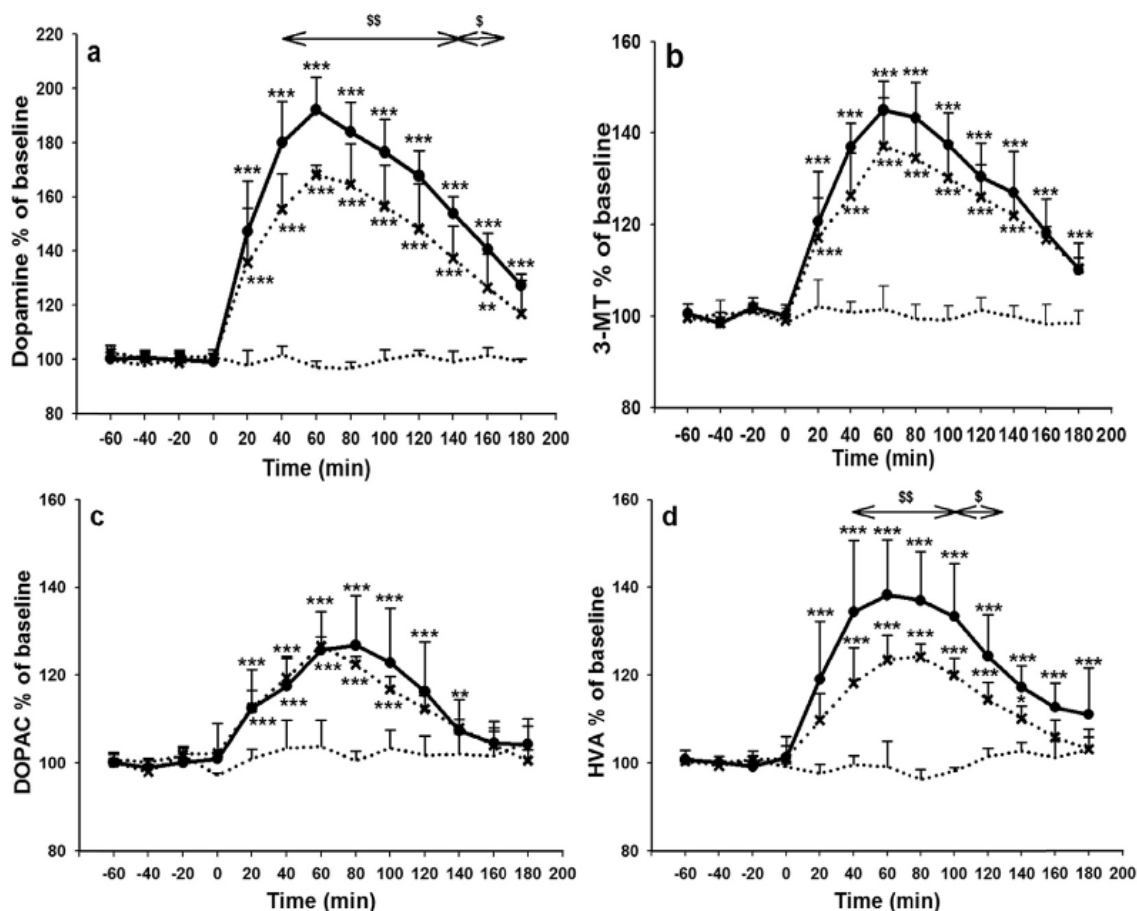
Jednorázová dávka JMV2959 6 mg / kg i.p. během morfinové abstinence, podobně jako při akutním podání, mírně, ale statisticky významně snížila koncentraci 2-AG v NACSh na 92% baseline ( $P < 0,001$ ). JMV2959 6 mg / kg + fyziologický roztok vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P$

$< 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ . Aplikace dávky samotného fyziologického roztoku neměla vliv na změny v koncentraci 2-AG v NACSh.

Baseline koncentrace 2-AG se mezi zvířaty v rámci sub-chronického experimentu nelišily. Nicméně bazální koncentrace u sub-chronického experimentu byly výrazně nižší oproti bazálním koncentracím 2-AG v experimentu akutním (Obrázek č. 10d); akutní baseline vs. sub-chronická baseline:  $T = 6500,0$ ,  $DF = 208$ ;  $P < 0,001$ , dvouvzorkový t-test.

#### **4.5 Účinky morfinu na uvolnění dopaminu a jeho metabolismus u morfinem senzitivizovaných potkanů (Jerabek et al 2017)**

Baseline dopaminových metabolitů se mezi akutním a sub-chronickým podáním morfinu významně nelišily. Dle očekávání (znázorněno na Obrázku č. 11a), systémové podání morfinu 5 mg / kg 12. den abstinence, jež následovalo po pěti dnech opakovaných aplikací morfinu (10, 20, 20, 40, 40 mg/kg), způsobilo statisticky významné zvýšení extracelulární koncentrace dopaminu v NAC (core-shell) potkana v porovnání s morfinovými účinky akutními, kdy morfin byl podán po 5 dnech opakovaného podávání fyziologického roztoku. Tímto byla potvrzena senzitivizace v NAC. Dvoucestná analýza ANOVA RM a následně Bonferroniho test ukázaly významný efekt skupiny: fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + skupina s akutním podáním morfinu ( $P < 0,01$ ) a času ( $P < 0,001$ ); časový průběh dopaminergních změn po sub-chronickém / akutním podání morfinu byl v rámci těchto skupin významně odlišný (čas vs. interakce skupiny:  $P = 0,001$ ). Akutním i sub-chronickým podáním vyvolaný vzestup koncentrací dopaminu v porovnání s baseline byl také významný ( $P < 0,001$ ) s maximem po 60 minutách po podání (168% a 194% baseline). Bazální hladiny dopaminu se mezi zvířaty významně nelišily jak u akutního, tak sub-chronického podávání morfinu.



**Obrázek č. 11** (Jerabek et al 2017)

Podáním morfinu vyvolaný vzestup koncentraci dopaminu a jeho metabolitů v NAC u potkanů senzitivovaných morfinem. Morfin 5 mg / kg (akutní / sub-chronický experiment) byl injikován s.c. 20 min po i.p. podání fyz. roztoku (0,1 ml / 100 g tělesné hmotnosti) potkanům senzitivovaným morfinem nebo kterým byl chronicky aplikován fyz. roztok (n = 6; průměr ± SEM). Změny v koncentracích dopaminu v NAC jsou zobrazeny v grafu **a**, změny v 3-MT v grafu **b**, změny v DOPAC v grafu **c** a změny v HVA v grafu **d**. Účinky jsou ilustrovány následovně: fyziologický roztok + morfin u potkanů senzitivovaných morfinem (plný kruh), fyziologický roztok + akutní morfin (tečkované s křížem), fyziologický roztok + fyziologický roztok (tečkované). Rozdíly mezi podáním a baseline v rámci skupiny jsou vyjádřeny jako \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ . Rozdíly mezi skupinami jsou vyjádřeny jako \$\$  $P < 0,01$ , \$  $P < 0,05$ .

Extracelulární koncentrace metabolitů dopaminu 3-MT a DOPAC (Obrázek č. 11b, c) se při akutním i sub-chronickém podání významně nelišily. Koncentrace HVA

(Obrázek č. 11d) byly dočasně významně vyšší u potkanů senzitivizovaných morfinem v porovnání s akutním podáním morfinu (fyz. roztok + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + akutní morfin: efekt skupiny:  $P < 0,05$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P = 0,001$ ).

#### **4.6 Účinky antagonisty GHS-R1A na morfinem indukovanou dopaminergní senzitivizaci v NAC (Jerabek et al 2017)**

Účinky ghrelinového antagonismu jsou zobrazeny na Obrázku č. 12a. Úrovně baseline se mezi zvířaty v experimentu významně nelišily. Jak bylo uvedeno výše, dávka morfinu 5 mg / kg vyvolala zvýšení koncentrace dopaminu v NAC u potkanů, kteří byli předtím senzitivizováni morfinem (fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ).

Podání antagonisty JMV2959 v dávkách 3 a 6 mg / kg i.p. významně a na dávce závisle snížilo provokační dávkou morfinu (challenge) vyvolaný vzestup koncentrací dopaminu v NAC (core-shell) (JMV2959 3 mg / kg + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ; JMV2959 6 mg / kg + morfin 5 mg / kg vs. fyz. roztok + morfin 5 mg / kg: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ). Nicméně v obou skupinách podání JMV2959 zůstal morfinem způsobený vzestup ve srovnání s baseline stále statisticky významný ( $P < 0,001$ ), s maximem účinku po 60 minutách po podání: 92% baseline v případě 3 mg / kg a 41% u 6 mg / kg JMV2959. Samotná dávka JMV2959 3 mg / kg nevyvolala žádný účinek na koncentraci dopaminu v NAC. Podání JMV2959 6 mg / kg vyvolalo menší, ale dočasně významný, pokles koncentrace dopaminu v NAC (JMV2959 6 mg / kg + fyz. roztok vs. fyz. roztok + fyz. roztok: efekt skupiny:  $P < 0,05$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ). Podání samotného fyziologického roztoku nemělo žádný vliv na změnu koncentrace dopaminu v NAC.

#### **4.7 Účinky antagonisty GHS-R1A na morfinem indukované změny v koncentracích metabolitů dopaminu v NAC při aplikaci během morfinové abstinence (Jerabek et al 2017)**

Vliv ghrelinového antagonismu na změny extracelulární koncentrace metabolitů dopaminu v NAC vyvolané provokační dávkou morfinu (challenge, 5 mg / kg s.c.) ve 12. den abstinence, jež následovala po pěti dnech opakovaného podávání morfinu je zobrazen na Obrázku č. 12 (b, c, d).

##### **4.7.1 3-MT**

U 3-MT (Obrázek č. 12b) vyvolalo výše uvedené podání statisticky významné zvýšení koncentrace tohoto metabolitu s maximem 60 min po podání morfinu (145% baseline) (fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ). Premedikace JMV2959 3 a 6 mg / kg statisticky významně a prakticky shodně v obou dávkách snížila morfinem vyvolané zvýšení koncentrace 3-MT v NAC (JMV2959 3 mg / kg + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg: efekt skupiny:  $P = < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ; JMV2959 6 mg / kg + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg: efekt skupiny:  $P = < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ). Maximální nárůst koncentrace 3-MT vyvolaný podáním morfinu byl pozorován 60 min po podání premedikace JMV2959 3 mg / kg a 100 minut po podání JMV2959 6 mg / kg (127% resp. 124% baseline). Samotné podání JMV2959 3, resp. 6 mg / kg neovlivnilo koncentraci 3-MT. To samé platilo i pro fyziologický roztok.

##### **4.7.2 DOPAC**

Vliv podání antagonisty JMV2959 na morfinem indukované zvýšení koncentrace DOPAC je zobrazeno na Obrázku č. 12c. Podání morfinu 5 mg / kg statisticky významně zvýšilo koncentraci DOPAC v NAC (126% baseline) v čase 80

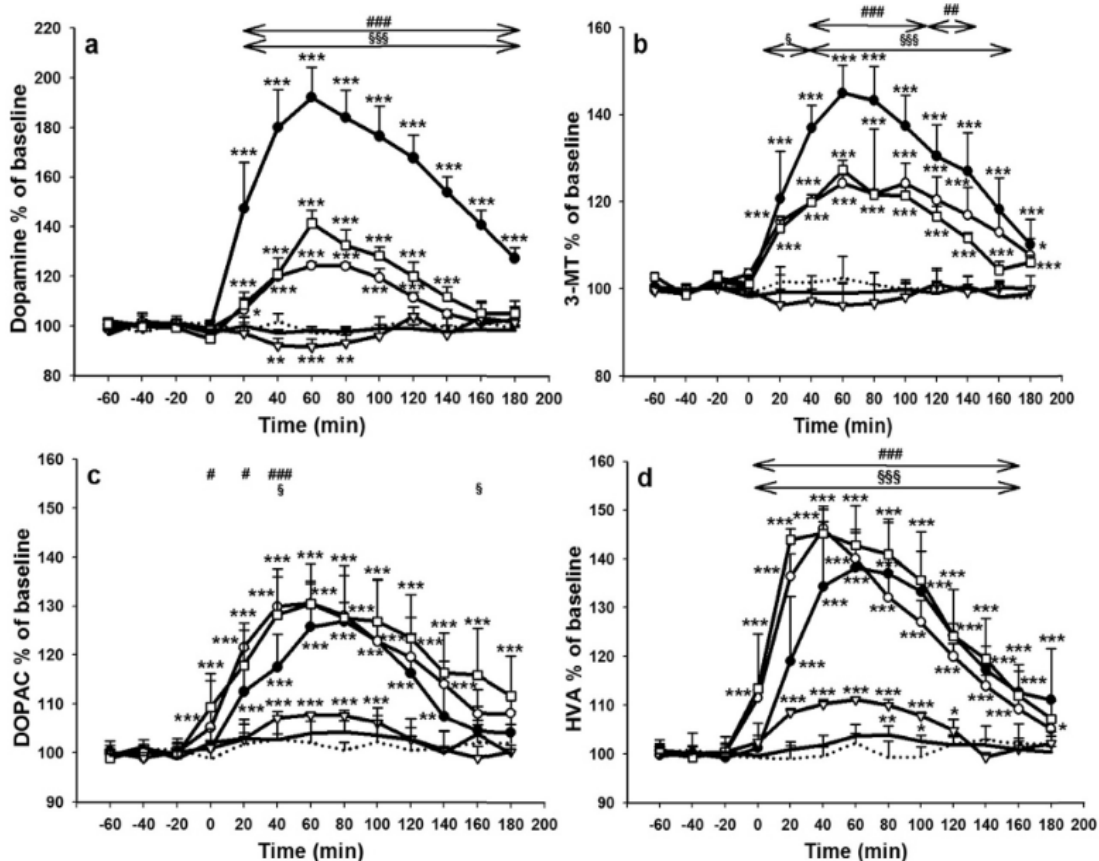
min po morfinové injekci (fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ). Premedikace JMV2959 v koncentraci 3, stejně jako 6 mg / kg mírně, ale pouze dočasně statisticky významně zvýšila nárůst koncentrace DOPAC vyvolané morfinem v NAC (131% baseline) v čase 60 min po morfinové aplikaci (JMV2959 3 mg / kg + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg: efekt skupiny – bez statistické významnosti; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,05$ ; JMV2959 6 mg / kg + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg: efekt skupiny – bez statistické významnosti; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,05$ ). Samotné podání JMV2959 3 mg / kg neovlivnilo koncentraci DOPAC. Vyšší dávka JMV2959 6 mg / kg mírně (dočasně statisticky významně) zvýšila koncentraci DOPAC na 108% baseline v čase 60 min po aplikaci (JMV2959 6 mg / kg + fyziologický roztok vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok: účinek skupiny – bez statistické významnosti; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ). Aplikace samotného fyziologického roztoku neměla vliv na změny koncentrace DOPAC.

#### **4.7.3 HVA**

Vliv podání antagonisty JMV2959 na morfinem indukované zvýšení koncentrace HVA je zobrazeno na Obrázku č. 12d. Podání morfinu 5 mg / kg vyvolalo významné zvýšení koncentrace HVA v NAC na 138% baseline v čase 60 min po aplikaci morfinové injekce (fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ). Premedikace JMV2959 3 a 6 mg / kg statisticky významně zesílila zvýšení koncentrace HVA vyvolané morfinem na 144% resp. 146% baseline v čase 40 min po podání morfinu (JMV2959 3 mg / kg + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg: efekt skupiny – bez statistické významnosti; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ; JMV2959 6 mg / kg + morfin 5 mg / kg vs. fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg: efekt skupiny – bez

statistické významnosti; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ). Podání samotného JMV2959 3 mg / kg mírně zvýšilo nárůst koncentrace HVA v čase 80 a 100 min po aplikaci fyziologického roztoku na hranici statistické významnosti (104% baseline) (JMV2959 3 mg / kg + fyziologický roztok vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok: efekt skupiny – bez statistické významnosti; efekt času:  $P < 0,05$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,05$ ). Vyšší dávka JMV2959 6 mg / kg rovněž nepatrně a dočasně statisticky významně zvýšila koncentrace HVA v NAC na 111% baseline (JMV2959 6 mg / kg + fyziologický roztok vs. fyziologický roztok + fyziologický roztok: efekt skupiny:  $P < 0,001$ ; efekt času:  $P < 0,001$ ; čas vs. interakce skupiny:  $P < 0,001$ ). Aplikace samotného fyziologického roztoku neměla vliv na změny koncentrace HVA.





**Obrázek č. 12** (Jerabek et al 2017)

Vliv antagonisty ghrelinového receptoru GHS-R1A, látky JMV2959 na morfinem vyvolané změny extracelulárních koncentrací dopaminu a jeho metabolitů v NAC potkanů. JMV2959 byl vždy podáván i.p. 20 minut před podáním morfinu / s.c. injekce fyziologického roztoku ( $n = 6$ ; průměr  $\pm$  SEM). Změny koncentrací jsou zobrazeny v grafu **a**, změny v 3-MT v grafu **b**, DOPAC v grafu **c** a HVA v grafu **d**. Účinky jsou zobrazeny následovně: fyziologický roztok + morfin 5 mg / kg (plný kruh), JMV2959 6 mg / kg + morfin 5 mg / kg (prázdný kruh), JMV2959 3 mg / kg + morfin 5 mg (prázdný čtverec), JMV2959 3 mg / kg + fyz. roztok (souvislá čára), 6 mg / kg JMV2959 + fyziologický roztok (prázdný trojúhelník), fyziologický roztok + fyziologický roztok (tečkovaná čára). Rozdíly mezi jednotlivými podáními a průměrem baseline jsou vyjádřeny jako \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ . Rozdíly mezi skupinami fyziologického roztoku + morfinu vs. JMV2959 6 mg / kg + morfinu nebo fyziologického roztoku + morfinu vs. JMV2959 3 mg / kg + morfinu jsou vyjádřeny jako ###  $P < 0,001$ , ##  $P < 0,01$ , #  $P < 0,05$  nebo §§§  $P < 0,001$  a §  $P < 0,05$ .

#### 4.8 Účinky antagonisty GHS-R1A na akutním morfinem indukované změny chování (Sustkova-Fiserova et al 2014, Sustkova-Fiserova et al 2016)

Během všech experimentů CNS mikrodialýzy *in vivo* jsme současně během mikrodialýzy monitorovali chování zvířat. Jednotlivé typické prvky v chování jsme v rámci kategorií – *imobilita*, *lokomoce*, *katalepsie*, *stereotypie* a další hodnotili:

a) procentuálně, tedy kolik procent z celkových 100% během 20 min odběrového intervalu strávilo zvíře určitým typem chování (Sustkova-Fiserova et al 2014), což poskytuje o změnách v chování souhrnný přehled.

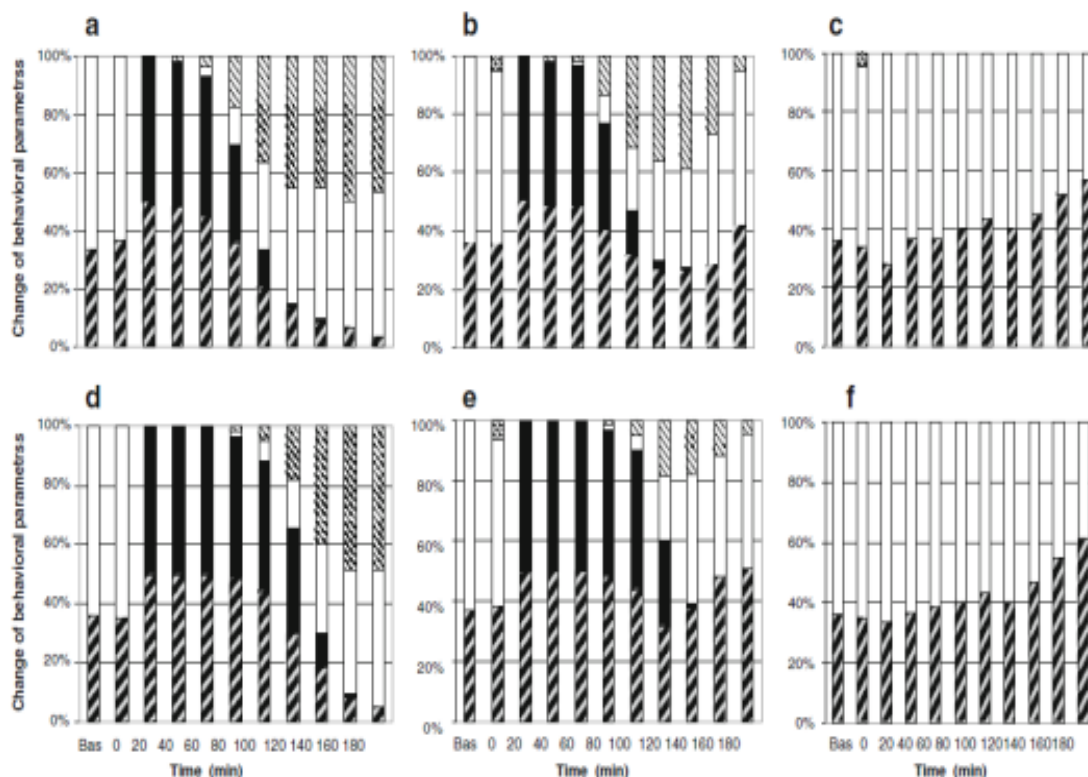
b) jsme skórovali jednotlivé prvky chování na škále od 0 do 3 (Sustkova-Fiserova et al 2016), což umožňuje bližší popis změn v jednotlivých kategoriích chování. Ve všech experimentech jsme pozorovali pro opioidy typické morfinem indukované bifázické změny v chování u potkanů: nejprve inhibiční fázi (ztuhnutí svalů trupu, katalepsie, nehybnost nebo omezený pohyb, exoftalmus, naježená srst atp.) následovanou po nějaké době (v závislosti na podané dávce) fází stimulační, provázenou zvýšeným lokomotorickým pohybem (panáčkování, chůze, očichávání, čištění) a stereotypním chováním (stereotypní čenichání, olizování, žvýkání). JMV2959 v nejvyšší podané dávce (6 mg/kg i.p.) navozoval u zhruba 40% potkanů přechodné změny v chování (protahování, sedace) jež byly přerušeny při tlesknutí nebo dotyku (šlo tedy o centrální efekty, ne o periferní poruchy) a kompletně vymizely během prvních 20 min po podání JMV2955. U nižších dávek JMV2959 jsme tyto změny nepozorovali.

Oběma metodami monitorování chování u potkanů jsme ověřili, že premedikace JMV2959 před podáním akutní dávky morfinu významně snížila výskyt opioidních stereotypních prvků (žvýkání, olizování, stereotypní čenichání) a snížila lokomoci, resp. příslušně zvýšila imobilitu v chování zvířat. Katalepsie prakticky nebyla ovlivněna (tendence ke zkrácení fáze katalepsie, po-morfinové ztuhnutí svalů trupu).

#### 4.8.1 Ad výsledky obsažené v publikaci Sustkova-Fiserova 2014 – pozorované změny v chování vyjádřené v procentech

Změny v chování jsou znázorněny na Obrázku č. 13 (a až d). Změny jsou zde vztaženy k výchozím bazálním hodnotám a jsou uvedeny v procentech (průměr 60 min = tři dvacetiminutové intervaly průměru hodnot baseline); Hodnota 0 min znázorňuje časový interval po premedikaci (JMV2959 6 mg / kg nebo fyziologickým roztokem), po kterém následovalo 20-180 min účinku morfinu, nebo fyziologického roztoku.

Statisticky významné účinky dávky 5 mg / kg morfinu byly viditelné ve všech hodnocených kategoriích chování. Obrázek č. 13a: (ve všech případech  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroniho test versus kontrolní skupina). Počáteční morfinem způsobený inhibiční účinek (nehybnost a katalepsie) během doby 0-80 min byl následován výraznou stimulací chování (zvýšená lokomoce s významnými stereotypiemi), která přetrvávala až do konce experimentu.



**Obrázek č. 13** (Sustkova-Fiserova et al 2014)

Účinek antagonisty GHS-R1A na morfinem indukované změny v chování potkanů v pěti rozdílných sledovaných parametrech: imobilita (široké diagonální pruhy), katalepsie (černá), lokomoce (bílá), stereotypní aktivita (úzké diagonální pruhy) a ostatní (vzor mřížky). Parametry jsou zobrazeny v procentech jednotlivých parametrů během každého 20 min. intervalu (součet chování = 100%, n = 6). JMV2959 byl vždy podáván i.p. 20 min. před morfinem / fyz. roztokem (s.c.). Změny v chování jsou uváděny ve vztahu k baseline (průměr 60 min. baseline intervalu), časový interval po premedikaci JMV2959 / fyz. roztokem (0) je následován 20 – 180 min. efektem morfinu / fyz. roztoku. Výsledky byly získány během mikrodialýzy potkanů, kterým byl podáván **a** fyz. roztok + MO 5 mg/kg, **b** JMV2959 6 mg/kg + MO 5 mg/kg, **c** JMV2959 6 mg/kg + fyz. roztok, **d** fyz. roztok + MO 10 mg/kg, **e** JMV2959 6 mg/kg + MO 10 mg/kg, **f** fyz. roztok + fyz. roztok. Změny chování u potkanů, kterým byl podáván JMV2959 3 mg/kg + MO 10 mg/kg nejsou prezentovány.

Dávka morfinu (10 mg / kg s.c.) (na Obrázku č. 13d) rovněž vyvolala statisticky významné změny (ve všech případech  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroniho test, měřeno proti kontrolní skupině), s mnohem déle přetrvávající inhibicí chování (která trvala přibližně 2 hodiny). Během 120 minutového intervalu, se pomalu začala projevovat změna inhibičního chování a začaly se projevovat excitační znaky (lokomoce, významná stereotypní aktivita po 120 minutách). Výrazná stimulace byla pozorována během posledních tří intervalů.

Premedikace JMV2959 (6 mg / kg i.p.) výrazně snížila behaviorální stimulaci vyvolanou morfinem (oběma dávkami), ale bifázický účinek zde zůstal zachován (ve všech případech  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroniho test, měřeno proti kontrolní skupině) (ve všech případech  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroniho test, měřeno proti kontrolní skupině).

Premedikace JMV2959 (6 mg / kg i.p.) před dávkou morfinu (5 mg / kg s.c.) (Obrázek č. 13b) výrazně snížila projevy stereotypního chování (byly sníženy projevy očichávání, ohlodávání a olizování) a zkrátila jejich trvání během posledního intervalu ( $P < 0,001$ , dvoucestná ANOVA, Bonferroniho test). Projevy imobility byly významně sníženy během poslední 1,5 hodiny dialýzy ( $P < 0,001$ , dvoucestná ANOVA, Bonferroniho test). Premedikace JMV2959 (6 mg / kg i.p.) před podáním morfinu (5 mg / kg s.c.) významně neovlivnila morfinem vyvolanou katalepsií a lokomoci, pozorovali jsme ale, ačkoli nevýznamně, méně projevů rearingu a chůze.

Premedikace JMV2959 (6 mg / kg i.p.) před dávkou morfinu (10 mg / kg s.c.) (Obrázek č. 13e) významně snížila a zkrátila trvání projevů stereotypního chování ( $P <$

0,001, dvoucestná ANOVA, Bonferroniho test) spolu se značným zlepšením v projevech nehybnosti ve stejný časový interval ( $P < 0,001$ , dvoucestná ANOVA, Bonferroniho test). Rovněž podáním morfinu (10 mg / kg s.c.) indukovaná katalepsie byla významně snížena a zkrácena v případě premedikace JMV2959 (6 mg / kg i.p.) ( $P < 0,001$ , dvoucestná ANOVA, Bonferroniho test), a kvůli sníženým projevům stereotypního chování se projevy lokomoce během 140 minutového časového intervalu staly významně pozorovatelnějšími ( $P < 0,001$ , dvoucestná ANOVA, Bonferroniho test).

Premedikace JMV2959 (3 mg / kg i.p.) před podáním dávky morfinu (10 mg / kg s.c.) (nezobrazeno v grafu) také významně snížila projevy stereotypního chování (zejména olizování a očichávání), ale účinky JMV2959 byly menší než po podání dávky 6 mg / kg i.p. ( $P < 0,001$ , dvoucestná ANOVA, Bonferroniho test). Projevy imobility byly poměrně posíleny ( $P < 0,001$ , dvoucestná ANOVA, Bonferroniho test). Také po premedikaci JMV2959 (3 mg / kg s.c.), byla morfinem indukovaná katalepsie snížena ( $P < 0,05$ , dvoucestná ANOVA, Bonferroniho test) a lokomoce byla významně zvýšena během 140 minutového časového intervalu ( $P < 0,05$ , dvoucestná ANOVA, Bonferroniho test). Bifázický (inhibice-stimulace), morfinem indukovaný, účinek přetrval (nehybnost:  $P < 0,05$ ; katalepsie:  $P < 0,001$ ; lokomoce:  $P < 0,001$ ; stereotypní aktivity:  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroniho test, měřeno proti kontrolní skupině). Podání samotné látky JMV2959 (3 mg / kg i.p.) nevyvolalo žádné účinky významně odlišné od podání fyziologického roztoku.

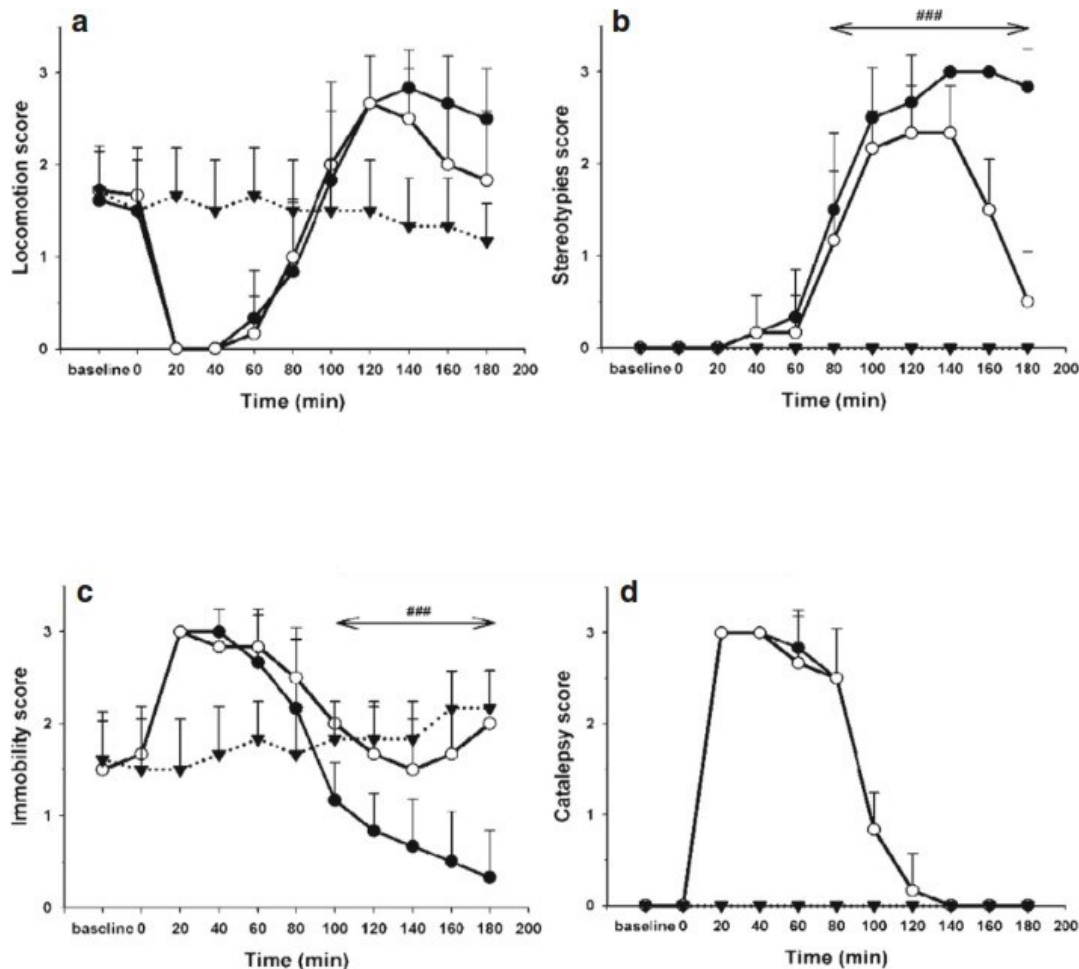
Podání samotné dávky JMV2959 (6 mg / kg i.p.) (Obrázek č. 13c) způsobilo dočasné změny chování u 38,89% pokusných zvířat a to vždy během prvního intervalu (0 min). Bylo pozorováno, že chování podobné protahování (kategorie další příznaky chování) může být zcela eliminováno zvukem (např. tlesknutí), nebo dotykem experimentátora během prvního měřeného intervalu a spontánně ve všech případech vymizelo před podáním morfinu nebo fyziologického roztoku (20 min po podání 6 mg / kg JMV2959 i.p.). Během posledních dvou intervalů mikrodialýzy (160 - 180 min), byla pozorována zvýšená ospalost ve skupině, kde bylo podáno 6 mg / kg i.p. látky

JMV2959, což bylo rovněž pozorováno ve skupině, kde se podával fyziologický roztok (Obrázek č. 13f; ve všech případech  $P < 0,001$ ; jednocestná ANOVA RM, Bonferroniho test, měřeno proti kontrolní skupině).

#### **4.8.2 Ad výsledky obsažené v publikaci Sustkova-Fiserova 2016 – pozorované změny v chování podle kategorií**

Pozorované změny v chování jsou znázorněny na Obrázku č. 14. Změny v chování (skóre 0-3) jsou zobrazeny s ohledem na podmínky baseline podle kategorií (průměr 60 minut = 3 x 20 min. časové intervaly baseline – kontrolní hodnoty baseline); hodnota 0 min ukazuje časový interval po premedikaci látkou JMV2959 3 mg / kg nebo 6 mg / kg a nebo fyziologickým roztokem, po které pak následuje 20-180 min účinku morfinu nebo fyziologického roztoku. Morfin aplikovaný ve všech dávkách vyvolal významné a očekávané změny ve srovnání s fyziologickým roztokem {v souladu s (Fiserova et al 1999, Sustkova-Fiserova et al 2014)}. Nicméně, naše hlavní zaměření bylo na monitorování projevů způsobených premedikací JMV2959 (které jsou také vyznačeny v grafech). Akutním morfinem 5 mg / kg vyvolané změny pro každou ze čtyř sledovaných kategorií změn v chování jsou zobrazeny na Obrázku 14 (a až d). Nejpozoruhodnější z významných účinků premedikace JMV2959 6 mg / kg byly spojeny se stereotypy vyvolanými morfinem, kde 80 minut po aplikaci morfinu bylo možno sledovat mnohem méně projevů očichávání a ohlodávání s absencí projevů stereotypního olizování. Během posledních 60 minut vystavení účinkům morfinu byly redukovány i projevy lokomoce, ovšem ne dostatečně statisticky významně. Rovněž

výrazně vzrostly projevy nehybnosti, zatímco projevy katalepsie zůstaly prakticky nezměněny (podrobnosti v příložené publikaci).



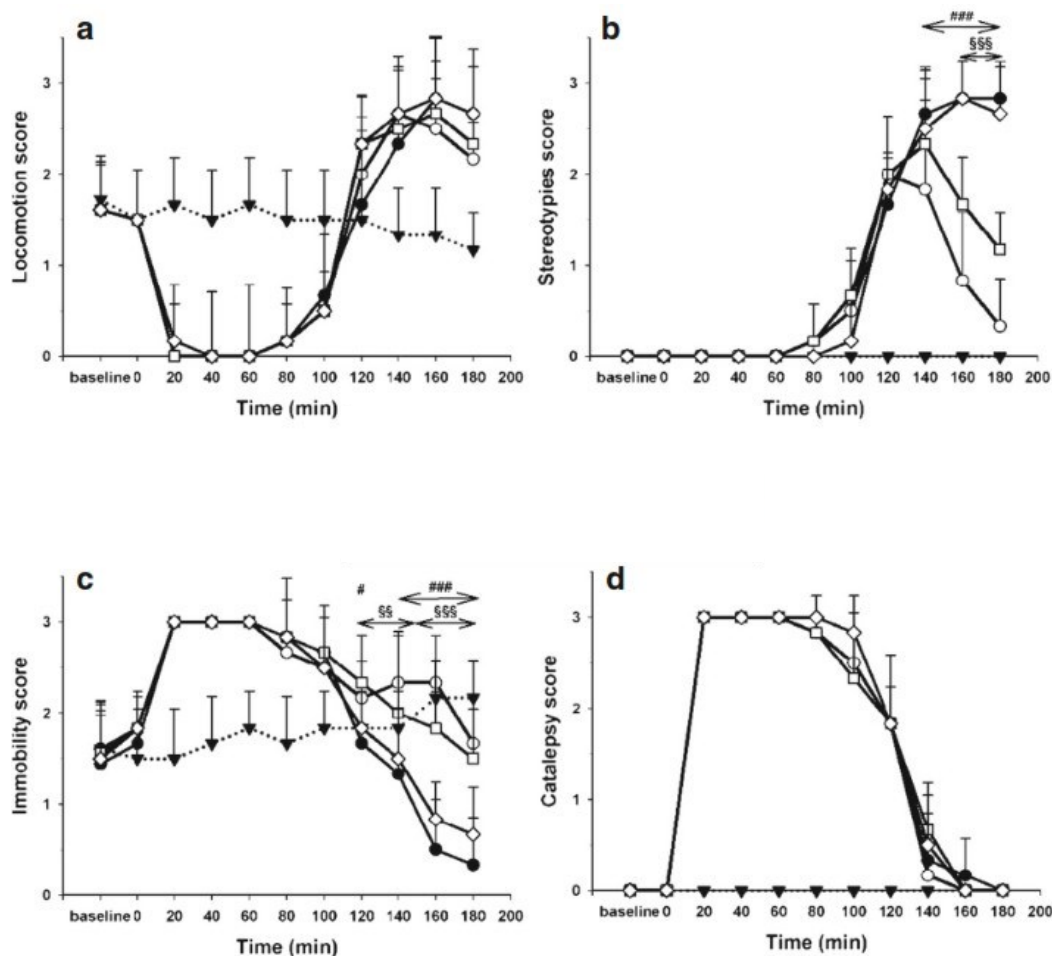
**Obrázek č. 14** (Sustkova-Fiserova et al 2016)

Účinky antagonisty GHS-R1A (JMV2959, 6 mg / kg) na akutním podáním morfinu 5 mg / kg vyvolané změny chování ve čtyřech pozorovaných kategoriích. Změny jsou zobrazeny jako průměry skóre (+/- SEM): **a** pohyb, **b** stereotypie, **c** nehybnost a **d** katalepsie. Behaviorální změny jsou vždy zobrazeny vzhledem k hodnotám baseline (průměr 60 min baseline). Časový interval po premedikaci JMV2959 / fyziologickým roztokem (0) je následován 20-180 min účinku morfinu / fyziologického roztoku. Změny chování jsou zobrazeny následovně: fyziologický roztok + morfin (plný kruh), JMV2959 + morfin (prázdný kruh), fyziologický roztok + fyziologický roztok (plný trojúhelník s tečkovanou čarou). Rozdíly v účincích morfinu a JMV2959 + morfinu jsou vyjádřeny jako ###  $P < 0,001$ . Účinek podání fyziologického roztoku + JMV2959 6 mg / kg (nejsou zobrazeny) byly srovnatelné s účinky ve skupině fyziologického roztoku + fyziologického roztoku, s tím rozdílem, že v intervalu 0-20 min po podání JMV2959 byly pozorovány příznaky protahování; nicméně tyto projevy byly patrné u méně než 40% potkanů a spontánně s časem vymizely.

Pozorování akutních, morfinem (10 mg / kg, s.c.) vyvolaných změn s fyziologickým roztokem společně s JMV2959 3 a 6 mg / kg s premedikací fyziologickým roztokem nebo ghrelinem, zařazených do kategorií chování jsou znázorněny na Obrázku č. 15 (a až d). Morfinem (10 mg / kg s.c.) vyvolaná katalepsie a nehybnost trvala déle než po nižší dávce morfinu, stejně jako stereotypní chování (120 minut po aplikaci morfinu). Typ a spektrum vlivu JMV2959 6 mg / kg na účinky vyvolané morfinem byly podobné jako u nižší dávky morfinu (podrobnosti v příložené publikaci).

Účinek 3 mg / kg JMV2959 na morfinem 10 mg / kg vyvolané změny chování byly podobné, ale méně vyjádřené (podrobnosti v příložené publikaci). Současné podávání ghreluinu 40 µg / kg i.p. k premedikaci 3 mg / kg JMV2959 vyrušilo samotný účinek JMV2959, tedy všechny behaviorální parametry v této skupině se významně nelišily od fyziologického roztoku + skupiny morfinu 10 mg / kg (podrobnosti v příložené publikaci). V rámci spektra stereotypních projevů v rámci této skupiny, kde byl aplikován ghrelin, bylo pozorováno mnoho projevů stereotypního ohlodávání, velice podobně, jako ve skupině kde byly aplikovány dávky ghreluinu jednotlivě (není ukázáno).





**Obrázek č. 15** (Sustkova-Fiserova et al 2016)

Účinky antagonisty GHS-R1A (JMV2959) 3 a 6 mg / kg v kombinaci s fyziologickým roztokem nebo ghrelinem 40 µg / kg na akutní morfinem 10 mg / kg vyvolané změny chování ve čtyřech sledovaných kategoriích jsou zobrazeny jako průměry skóre (+/- SEM): **a** pohyb, **b** stereotypie, **c** nehybnost a **d** katalepsie. Změny v projevech chování jsou zobrazeny následovně: fyziologický roztok + morfin (plný kruh), 6 mg / kg JMV2959 + morfin (prázdný kruh), 3 mg / kg JMV2959 s fyziologickým roztokem + morfin (prázdný čtverec), 3 mg / kg JMV2959 spolu s ghrelinem 40 µg / kg + morfin (prázdný diamant), fyziologický roztok + fyziologický roztok (plný trojúhelník s tečkovanou čarou). Rozdíly mezi morfinem a 6 mg / kg JMV2959 + morfinem nebo morfinem a 3 mg / kg JMV2959 + morfinové účinky jsou vyjádřeny jako ###  $P < 0,001$  nebo §§§  $P < 0,001$ . Rozdíly mezi morfinem a 3 mg / kg JMV2959 s ghrelinem + morfinem nebyly statisticky významné. Další podrobný popis je shodný s Obrázkem č. 14 výše.

Samotná dávka JMV2959 6 mg / kg (graf není znázorněn) způsobila dočasné změny v chování u méně než 40% zvířat a to vždy během prvního sledovaného intervalu (0 min). Typické, protahování podobné, znaky bylo možno zcela eliminovat

dotykem nebo zvukem během prvního intervalu a spontánně tyto projevy zmizely před aplikací morfinu, nebo fyziologického roztoku (20 minut po aplikaci 6 mg / kg JMV2959). Podobně jako u potkanů, kterým byl aplikován fyziologický roztok během posledních dvou intervalů dialýzy (160 - 180 min), byly pozorovány zvýšené projevy nehybnosti u potkanů, kterým byl aplikován JMV2959 v dávce 6 mg / kg (podrobnosti v příložené publikaci).

#### **4.9 Účinky antagonisty GHS-R1A na morfinem navozenou behaviorální senzitivizaci (Sustkova-Fiserova et al 2016, Jerabek et al 2017)**

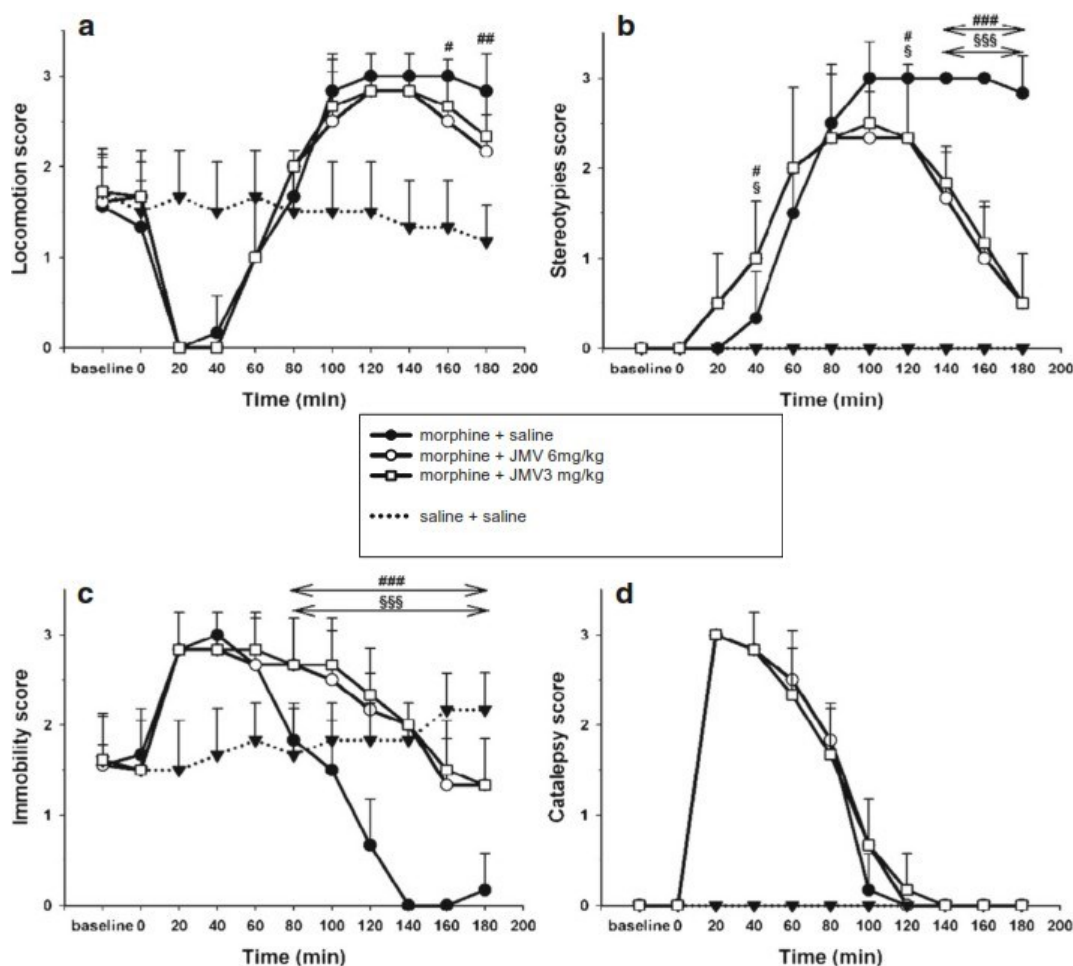
Opakovaná aplikace opioidů (podobně jako jiné návykové látky) navozuje behaviorální senzitivizaci. Provokační dávka (challenge) podaná během abstinence vyvolá u zvířat výraznější motorickou odpověď, než u zvířat naivních (akutní dávka). Zvýrazní se projevy stimulace a výskyt stereotypních prvků v chování (Robinson & Berridge 2003, Steketee & Kalivas 2011, Vanderschuren & Kalivas 2000). Model behaviourální senzitivizace bývá (s vědomím určitých limitů) využíván k výzkumu posilovací motivace, jež je základem bažení po droze při závislostech (Robinson & Berridge 1993, Vanderschuren & Kalivas 2000). V našich studiích pozorované významné snížení morfinové behaviorální senzitivizace po premedikaci JMV2959 svědčí o potenciálních možnostech užití ghrelinového antagonismu v léčbě resp. sekundární prevenci opioidní závislosti. Podrobnosti jsou uvedeny níže.

##### **4.9.1 Ad výsledky obsažené v publikaci Sustkova-Fiserova 2016 – pozorované změny v chování podle kategorií**

V případě podání morfinu 5 mg / kg ve 12. den abstinence následovaný dlouhodobým podáváním ( $n = 10$ ), byly pozorovány jasné známky senzitivizace chování (statisticky významně zvýšené stereotypní očichávání, ohlodávání a olizování, rearing a chůze, zkrácená fáze katalepsie). Účinky premedikace JMV2959 6 mg a 3 mg / kg

(viz Obrázek č. 16a-d), se zdají být prakticky shodné a jsou více jasně vyjádřené než v případě akutního podání. Projevy stereotypního chování a lokomoce byly výrazně redukovány a projevy nehybnosti se zvýšily po 80 - 120 minutách po podání morfinu (podrobnosti v příložené publikaci).

Samotná dávka 6 mg / kg JMV2959 podaná během morfinové abstinence vyvolala srovnatelný účinek na změny chování, jako při podání akutním. Pohyby podobné protahování se objevily u méně než 40% potkanů a spontánně zmizely během prvních dvaceti minut po injekci (není zobrazeno). Aplikace samotného fyziologického roztoku neměla žádný vliv na pozorované změny chování pokusných zvířat.



**Obrázek č. 16** (Sustkova-Fiserova et al 2016)

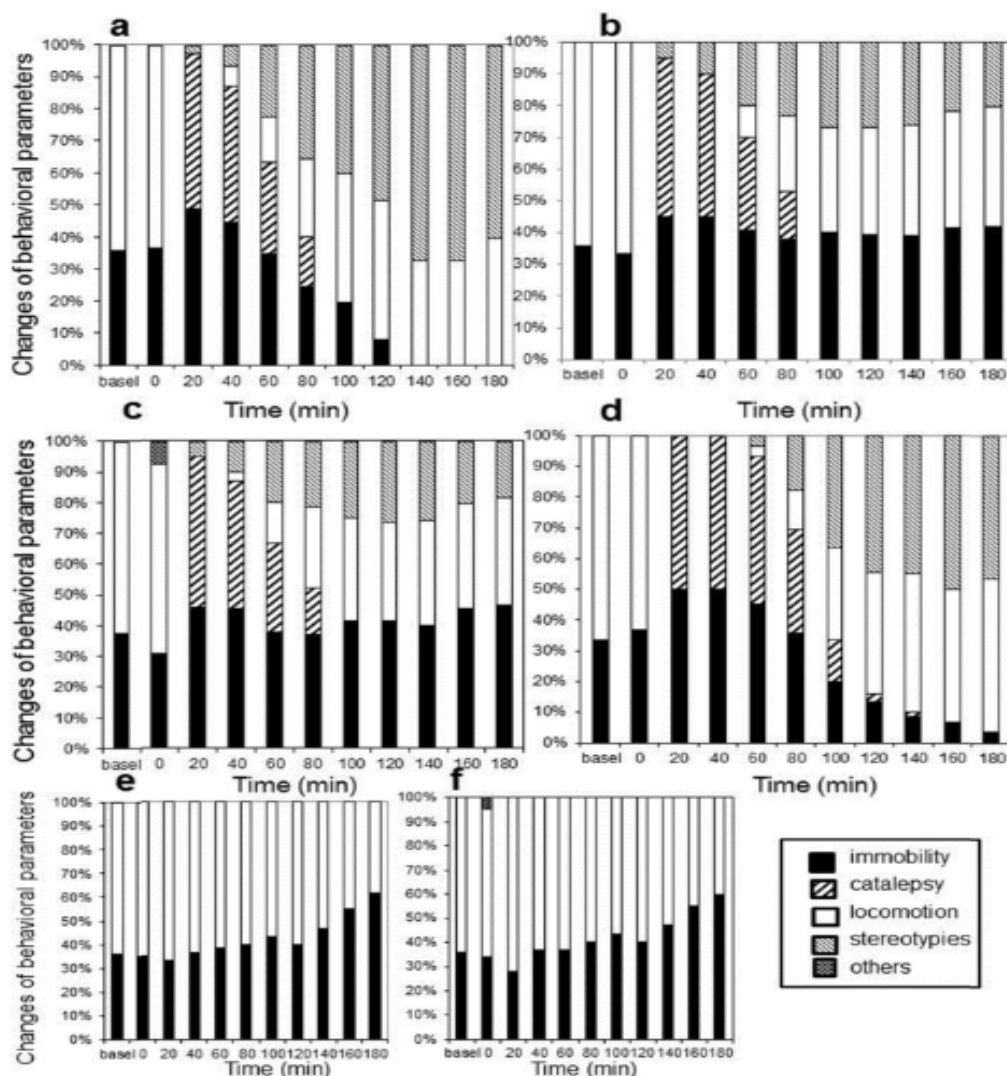
Účinky antagonisty GHS-R1A (JMV2959 3 a 6 mg / kg) na akutním podáním morfinu 5 mg / kg vyvolané změny chování ve čtyřech pozorovaných kategoriích. Změny jsou zobrazeny jako průměry skóre (+/- SEM): **a** pohyb, **b** stereotypie, **c** nehybnost a **d** katalepsie. Změny chování jsou zobrazeny následovně: fyziologický roztok + morfin (plný kruh), 6 mg / kg JMV2959 + morfin (prázdný kruh), 3 mg / kg JMV2959 s fyziologickým roztokem + morfin (prázdný čtverec), fyziologický roztok + fyziologický roztok (plný trojúhelník s tečkovanou čarou). Rozdíly mezi morfinem a 6 mg / kg JMV2959 + morfin nebo morfinem a 3 mg / kg JMV2959 + účinky morfinu jsou vyjádřeny jako ###  $P < 0,001$ , ##  $P < 0,01$ , #  $P < 0,05$  nebo §§§  $P < 0,001$ , §  $P < 0,05$ . Další podrobný popis je shodný s Obrázkem č. 14 výše.

#### **4.9.2 Ad výsledky obsažené v publikaci Jerabek et al 2017 - pozorované změny v chování vyjádřené v procentech**

Vliv antagonisty GHS-R1A na morfinem indukovanou behaviorální senzitivizaci je zobrazen na Obrázku č. 17 (a až f). Pozorované změny u potkanů během výše popsaných mikrodialyzačních experimentů jsou zobrazeny vzhledem k baseline (průměr 60 min = 3 x 20 min. časové intervaly baseline - kontrolní hodnoty baseline); 0 min ukazuje časový interval po premedikaci látkou JMV2959 3 nebo 6 mg / kg, nebo fyziologickým roztokem, po které pak následuje 20-180 min účinku morfinu, nebo fyziologického roztoku {v souladu s (Fiserova et al 1999, Sustkova-Fiserova et al 2014)}. Dle očekávání, při porovnání s akutními účinky (Obrázek č. 17d) byly pozorovány jasné známky senzitivizace chování po podání morfinu 5 mg / kg ve 12. den abstinence po sub-chronickém podávání morfinu (Obrázek č. 17a). Bylo pozorováno zvýšení stereotypního očichávání, ohlodávání a olizování, rearingu a chůze a rovněž zkrácená fáze katalepsie. Tyto výsledky jsou v souladu s naším, v minulosti prezentovaným, článkem (Sustkova-Fiserova et al 2016). Vliv premedikace JMV2959 3 a 6 mg / kg (viz Obrázek č. 17b, c) se zdá být prakticky identický: podaný morfin vyvolal u obou dávek projevy stereotypního chování a rovněž projevy zvýšené lokomoce byly výrazně redukovány. Projevy nehybnosti vzrostly v čase 80 - 180 minut po podání morfinu (podrobnosti v příložené publikaci).

JMV2959 3 mg / kg, podaný jako premedikace před podáním fyziologického roztoku, nevyvolal žádné změny chování u potkanů, stejně jako tomu bylo u potkanů, kterým byl aplikován fyziologický roztok. JMV2959 6 mg / kg podaný jako

premedikace před fyziologickým roztokem (viz Obrázek č. 17f) vyvolal dočasné změny v chování u méně než 40% potkanů a to vždy během prvního intervalu (0 min). Typické, protahování podobné, znaky bylo možno zcela eliminovat dotykem nebo zvukem během prvního intervalu a spontánně tyto projevy zmizely před aplikací morfinu, nebo fyziologického roztoku (20 minut po aplikaci 6 mg / kg JMV2959), což je zcela v souladu s pozorováním akutních účinků JMV2959 u potkanů kmene Wistar (Sustkova-Fiserova et al 2014). Podobně jako u podání fyziologického roztoku + fyziologického roztoku (viz Obrázek č. 17e) během posledních dvou intervalů mikrodialýzy (160 - 180 min), byla pozorována zvýšená nehybnost u dávek JMV2959 3 a 6 mg / kg + fyziologického roztoku (podrobnosti v příložené publikaci).



**Obrázek č. 17** (Jerabek et al 2017)

Účinek antagonisty GHS-R1A na morfinem indukované změny v chování potkanů v pěti rozdílných sledovaných parametrech: imobilita (černá), katalepsie (tenké diagonální pruhy), lokomoce (bílá), stereotypní aktivita (široké diagonální pruhy) a další příznaky / protahování (vzor mřížky). Parametry jsou zobrazeny v procentech jednotlivých parametrů během každého 20 min. intervalu (součet chování = 100%, n = 6). JMV2959 byl vždy podáván i.p. 20 min. před morfinem / fyz. roztokem (s.c.). Změny v chování jsou uváděny ve vztahu k baseline (průměr 60 min. baseline intervalu), časový interval po premedikaci JMV2959 / fyz. roztokem (0) je následován 20 – 180 min.

#### 4.10 Účinky antagonisty GHS-R1A na ovlivnění spontánní aktivity potkanů (Jerabek et al 2017)

Počáteční průzkumná lokomotorická aktivita potkana v testu v "otevřeném poli" (Ethovision), kde byla zvířata monitorována po dobu 20 min, nebyla významně ovlivněna podáním JMV2959 1, 3 ani 6 mg / kg (i. p. 25 min před MO / fyz. roztokem). Dvoucestná analýza ANOVA RM následována Bonferroniho testem neodhalila žádné statisticky významné rozdíly mezi účinky fyziologického roztoku a výše uvedenými třemi dávkami JMV2959 na parametry uběhnuté vzdálenosti (distance) a rychlosti (velocity) v trendu dvou na sobě závislých proměnných mezi prvním a druhým desetiminutovým časovým interavalem. Průměrné úrovně sledovaných parametrů chování během 20 min nebyly ve všech skupinách statisticky významné (jednocestná ANOVA). Analogicky, čas strávený zvířetem ve středu arény (central zone duration) nebyl rovněž statisticky významně ovlivněn podáváním dávek JMV2959 (jednocestná ANOVA). Hodnoty statistické významnosti jsou uvedeny v Tabulce č. 1.

<b>DISTANCE</b>			
<b>interval</b>	<b>0-10min</b>	<b>10-20min</b>	<b>total 20min</b>
<b>saline</b>	581.06+/-86.07	292.28+/-68.51	873.33+/-142.34
<b>JMV2959 1mg/kg</b>	672.41+/-67.82	278.37+/-44.17	950.78+/-102.44
<b>JMV2959 3mg/kg</b>	501.17+/-55.27	221.15+/-36.33	722.32+/-80.05
<b>JMV2959 6 mg/kg</b>	437.40+/-49.82	222.19+/-31.07	720.00+/-68.44
<b>VELOCITY</b>			
<b>interval</b>	<b>0-10min</b>	<b>10-20min</b>	<b>total 20min</b>
<b>saline</b>	0,97+/-0.14	0.49+/-0.11	0.73+/-0.12
<b>JMV2959 1mg/kg</b>	1.12+/-0.11	0.46+/-0.07	0.79+/-0.09
<b>JMV2959 3mg/kg</b>	0.84+/-0.09	0.37+/-0.06	0.60+/-0.07
<b>JMV2959 6 mg/kg</b>	0.73+/-0.08	0.37+/-0.05	0.60+/-0.06
<b>Two-way ANOVA RM time x group interaction <math>F_{3,32} = 0.598</math>, <math>P = 0.621</math> (n.s.)</b>			
<b>One-way ANOVA within total 20min among all groups: <math>F_{3,32} = 0.954</math>, <math>P = 0.426</math> (n.s.)</b>			

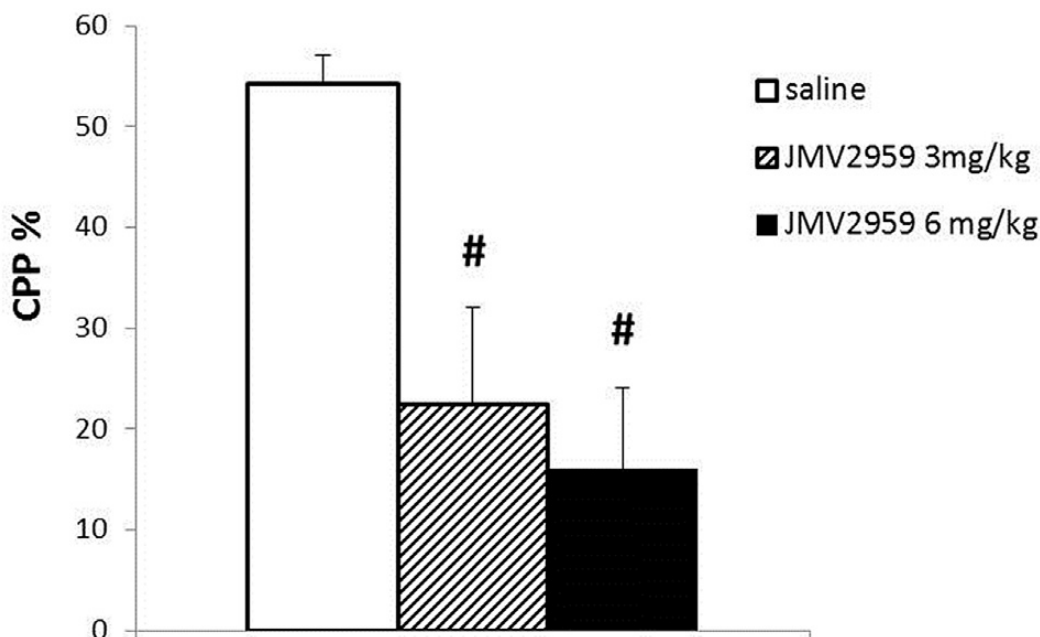
CENTRAL ZONE DURATION			
interval	0-10min	10-20min	total 20min
saline	16,24+/-7.02	6.73+/-3.90	22.97+/-7.57
JMV2959 1mg/kg	20.06+/-6.90	10.06+/-6.54	30.12+/-10.27
JMV2959 3mg/kg	4.19+/-1.95	6.87+/-4.06	11.05+/-5.94
JMV2959 6 mg/kg	4.98+/-2.35	8.26+/-5.99	13.24+/-24.43
<i>Two-way ANOVA RM time x group interaction <math>F_{3,32} = 1.284</math>, <math>P = 0.297</math> (n.s.)</i>			
<i>One-way ANOVA within total 20min among all groups: <math>F_{3,32} = 1.186</math>, <math>P = 0.331</math> (n.s.)</i>			

Tabulka č. 1

Přehled sledovaných parametrů s uvedenými hodnotami statistické významnosti při pozorování schopnosti látky JMV2959 ovlivnit spontánní aktivitu experimentálního zvířete.

#### 4.11 Účinky antagonisty GHS-R1A na ovlivnění morfinem podmíněné preference místa (Jerabek et al 2017)

V našem experimentálním provedení byla morfinem vyvolaná CPP jasně zřetelná a bylo možno pozorovat významné a na dávce závislé utlumení tohoto příznaku po jednorázovém podání 3 a 6 mg / kg JMV2959 den po „post-conditioning“ ( $P = 0,001$ ; viz Obrázek č. 18). Potkani byli umístěni do testovacího prostředí 20 minut po podání JMV2959, nebo fyziologického roztoku.



**Obrázek č. 18** (Jerabek et al 2017)

Účinky antagonisty GHS-R1A na morfinem vyvolanou CPP u potkanů. Po 8 dnech kondicionování s podáváním morfinu 10 mg / kg s.c., bylo podáno JMV2959 v jediné dávce 20 minut před testováním (n = 15 ve skupině JMV, n = 14 ve skupině s fyziologickým roztokem; průměr ± SEM). Účinky premedikace JMV2959 ve srovnání se skupinou fyziologického roztoku jsou vyjádřeny jako # P < 0,05.

## **5. Diskuse**

### **5.1 Vliv podání JMV2959 na morfinem vyvolané uvolnění dopaminu v NACSh (Jerabek et al 2017, Sustkova-Fiserova et al 2014, Sustkova-Fiserova et al 2016)**

Jak již bylo v úvodu diskutováno, látky navozující závislost při akutním podání aktivují dopaminergní přenos v NACSh a tento účinek (vyplavení dopaminu v nucleus accumbens) je spojován s pocitem odměny (reward) a určením důležitosti pro organismus, jež aktivuje celou řadu následných porovnávacích a podmiňovacích pochodů (Hyman et al 2006, Koob 1992, Koob & Volkow 2010). Pozorovaná spojitost masivního zvýšení koncentrace extracelulárního dopaminu v NACSh po akutním podání morfinu (5 a 10 mg / kg s.c.) je rovněž podporována daty literárními, které popisují efekt odměny po podání opioidů. (Koob & Volkow 2010, Leone et al 1991, Pothos et al 1991). Naše výsledky dokládají, že premedikace antagonistou GHS-R1A, látkou JMV2959 před akutním podáním dávky morfinu (5 a 10 mg / kg s.c.) významně, a v závislosti na dávce (JMV2959 3 a 6 mg / kg i.p.), snižuje morfinem vyvolané zvýšení hladiny dopaminu v NACSh (Sustkova-Fiserova et al 2014). Naše výsledky byly o rok později potvrzeny v pokusech u myši (Engel et al 2015). Z toho lze vyvodit, že centrální ghrelinový signální systém je pravděpodobně významně zapojen do systému regulace morfinem, resp. opioidy vyvolaných odměňovacích a posilovacích procesů v mezolimbickém systému, které jsou spojené se závislostí. V dalších studiích byla popsána redukce vylití dopaminu v NAC po premedikaci GHS-R1A antagonistou před akutním podáním alkoholu a stimulantů – kokainu, nikotinu a amfetaminu (Addolorato et al 2006, Davis et al 2007, Jerlhag et al 2010, Jerlhag et al 2009, Jerlhag



& Engel 2011, Tessari et al 2007, Wellman et al 2011, Wurst et al 2007, Zheng et al 2013).

Vyšší dávka látky JMV2959 (6 mg / kg i.p.) zcela neeliminuje účinky na změny hladiny dopaminu, vyvolanou podáním morfinu. Jedno z možných vysvětlení může být, že ghrelinový signalizační systém hraje důležitou, ale pouze modulující roli v počáteční dopaminergní aktivaci neurálního opioidního systému odměny (Engel et al 2015).

Dopaminergní senzitivizace odráží určitou formu neuronální plasticity ve které opakované podávání určitých látek vede k dlouhodobému zvyšování v aktivaci chování a zvyšování hladiny dopaminu v NAC. Má se za to, že tyto účinky mohou vést k lepšímu užívání těchto látek, ale i k vzniku závislosti (Robinson & Berridge 2003, Vezina 2004, Vezina 2007). Látky, které sice zvyšují koncentraci dopaminu akutně, ale selhávají, když jsou podány při pokusu o vyvolání senzitivizace během prodloužené abstinence, nejsou s těmito projevy spojovány (Vezina 2004). Mesolimbický dopaminergní systém je zapojen do zprostředkování jak stimulačních emočních, tak i senzibilizujících vlastností opioidů (Nakagawa et al 2011, Robinson & Berridge 1993, Spanagel et al 1993, Steketee & Kalivas 2011, Vanderschuren & Kalivas 2000). Během našich experimentů jsme zaznamenali významnou dopaminergní hypersenzitivitu na provokační dávku morfinu podanou ve 12. den morfinové abstinence. Tato hypersenzitivita je považována za projev dopaminergní senzibilizace, odehrávající se hlavně v jádře NAC, protože jak známo z literárních pramenů, prodloužená abstinence z neasociovaného opakovaného podávání opioidů je charakterizována zvýšeným uvolňováním dopaminu právě v této struktuře (Cadoni & Di Chiara 1999, Di Chiara 2002, Spanagel et al 1993). V průběhu našich experimentů jsme poprvé objevili, že ghrelinový antagonist významně a v závislosti na dávce snížil nárůst morfinem vyvolané dopaminergní senzibilizace, což potvrzuje významnou účast ghrelu na těchto procesech a také využití potenciální schopnosti ghrelinového antagonismu pro použití v terapii závislosti na opioidech. Předpokládá se, že dopaminergní hypersenzitivita v NAC může být právě předpokladem pro obnovení kompulzivního

chování při vyhledávání drogy (Robinson & Berridge 1993, Spanagel et al 1993, Vanderschuren & Kalivas 2000). Tyto výsledky jsou rovněž v souladu s naším dalším experimentem, při kterém bylo zapojení ghrelinového mechanismu během zvýšení dopaminu, způsobeného podáním morfinu, potvrzeno souběžným podáváním dávky ghrelinu. Významné snížení morfinem způsobeného uvolnění dopaminu po premedikaci JMV2959 v dávce 3 mg / kg bylo kompletně vyrušeno současným podáním ghrelinu v dávce 40 mg / kg v kombinaci s JMV2959 3 mg / kg. V současné době, na základě literárních pramenů, byl ghrelinový mezolimbický dopaminergní antagonismus pozorován při experimentech bez morfinové senzibilizace, při kterých bylo uvolňování dopaminu v NAC způsobeno akutním podáním alkoholu (Jerlhag et al 2009), kokainu, amfetaminu (Jerlhag et al 2010), nikotinu (Jerlhag & Engel 2011) a morfinu (Engel et al 2015, Sustkova-Fiserova et al 2014) rovněž významně sníženo. V našem předchozím experimentu (Sustkova-Fiserova et al 2014), podání JMV2959 v dávce 3, stejně jako 6 mg / kg neovlivnilo hladinu dopaminu v NAC, což je plně v souladu s literaturou, kde byla nižší dávka JMV2959 použita u potkanů (Jerlhag et al 2012). Také dávka JMV2959 3 mg / kg per se podávaná během abstinence po opakovaném podávání fyziologického roztoku nijak neovlivňovala hladinu dopaminu v NAC. Podání dávky JMV2959 6 mg / kg, která je již považována za poměrně vysokou dávku pro podání u potkanů, při abstinenci po podávání fyziologického roztoku, mírně a přechodně významně snížilo hladinu dopaminu v NAC. Přesto jsme pozorovali prakticky identické účinky premedikace oběma dávkami látky JMV2959 (3 a 6 mg / kg i.p.) na morfinem vyvolanou dopaminergní senzibilizaci, změny v koncentracích jeho metabolitů i behaviorální senzitivizaci a srovnatelně významný vliv i na morfinem indukovanou CPP. Vlastnosti JMV2959, kterému jsou přisuzovány antagonistické účinky na GHS-R1A jsme potvrdili souběžným podáváním ghrelinu v našem akutním experimentu.

## **5.2 Vliv podání JMV2959 na morfinem vyvolané zvýšení extracelulárních koncentrací metabolitů dopaminu v NACSh (Jerabek et al 2017, Sustkova-Fiserova et al 2014, Sustkova-Fiserova et al 2016)**

Analogicky ke zvýšení hladin dopaminu v NACSh, bylo podání akutní dávky morfinu (obou koncentrací), spojeno s významným, na dávce závislým, zvýšením hladin jeho metabolitů (DOPAC, 3-MT a HVA), podobné výsledky byly popsány v práci od Pothos et al., 1991 (Pothos et al 1991). Bylo pozorováno zvýšení koncentrací metabolitů dopaminu v NAC po podání morfinu během morfinové abstinence, ve srovnání se změnami po jeho akutním podání. I když významný rozdíl byl zjištěn pouze mezi hladinami HVA.

Naše výsledky jsou zhruba v souladu s literaturou (Airio et al 1994, Attila & Ahtee 1984, Pothos et al 1991). Naším hlavním zájmem pozorování byl ale účinek premedikace JMV2959 na tyto podáváním morfinu vyvolané změny. Podáním JMV2959 vyvolané výrazné snížení morfinem vyvolaného zvýšení hladiny dopaminu bylo spojeno s významným snížením hladiny 3-MT {produkt katechol-O-methyltransferázy (COMT)}. Na druhou stranu byl souběžně pozorován významný nárůst hladiny DOPAC {produkt monoaminoxidázy (MAO)} s významným zvýšením hladiny HVA, což je konečný produkt metabolismu dopaminu. Podání JMV2959 6 mg / kg samo o sobě mírně zvýšilo hladiny DOPAC a HVA, ale neovlivnilo hladiny 3-MT. Také nižší dávka JMV2959 3 mg / kg mírně a dočasně zvýšila hodnoty HVA. Zdá se tedy, že antagonismus GHS-R1A může být spojen se zvýšeným metabolismem dopaminu, způsobeným MAO, stejně jako bylo nedávno popsáno, že rovněž ghrelin zvyšuje obrát dopaminu v NAC (Anderberg et al 2016). Je však třeba dalšího podrobného výzkumu.

### **5.3 Vliv podání JMV2959 na morfinem vyvolané změny v koncentracích hladin endokanabinoidů (AEA, 2-AG) v NACSh (Sustkova-Fiserova et al 2016)**

Naše výsledky poprvé naznačily vliv ghrelinové signalizace na průběh morfinem vyvolaných změn v extracelulárních koncentracích endokanabinoidů AEA a 2-AG v mezolimbickém systému.

Endokanabinoidní systém je stěžejní pro posilovací vlastnosti opioidů (Caille & Parsons 2003, De Vries et al 2003, Navarro et al 2001, Solinas et al 2003). Během mikrodialyzačních experimentů, akutní subkutánní podání morfinu 5 a 10 mg / kg vyvolalo významné a protichůdné změny v koncentracích extracelulárních endokanabinoidů v NACSh: na dávce závislé zvýšení koncentrace AEA s maximem nárůstu na 117 a 142% baseline, a pokles koncentrace 2-AG na 86 a 85% baseline, což bylo v souladu s dřívější prací Vigano a kol. (Vigano et al 2004) (post mortem experiment s tkáněmi z NAC). Zjištěné koncentrace baseline obou endokanabinoidů AEA a 2-AG v NACSh u naivních zvířat byly zhruba v souladu s literaturou (Caille et al 2007, Felder et al 1996, Vigano et al 2004, Wiskerke et al 2012).

V sub-chronickém experimentu s modelem senzitivace byly měřeny změny v koncentraci endokanabinoidů po podání provokační dávky morfinu ve 12. den abstinenční periody, tedy v době, kdy již vymizely příznaky odnětí drogy (morfinu). Ve srovnání s experimenty s akutním podáním, bylo pozorováno významné snížení baseline koncentrace 2-AG před podáním dávky morfinu, zatímco baseline koncentrace extracelulární AEA zůstaly v NACSh nezměněny. Ve srovnání s akutním podáním vyvolala aplikace provokační dávky morfinu (5 mg / kg s.c.) významně vyšší pokles koncentrace 2-AG (na 75% průměru baseline) a významně vyšší zvýšení koncentrace AEA (na 126% průměru baseline). Tyto výsledky jsou rovněž v souladu s publikovanými výsledky Vigano a kol. (Vigano et al 2004), ovšem se třemi výjimkami - Vigano pozoroval zvýšení koncentrace baseline u AEA během období morfinové abstinence a tyto výsledky srovnával s výsledky zvířat, kterým nebyl aplikován morfin. Rovněž toto podání provokační dávky morfinu nezpůsobilo žádné

další zvýšení koncentrace AEA. A do třetice, provokační dávka morfinu vyvolala pokles v koncentraci 2-AG, který byl ale mírnější než po akutní aplikaci morfinu. Nicméně, Vigano a kol. (Vigano et al 2004) analyzovali koncentrace endokanabinoidů v roce 2004 z post mortem NAC tkáně v modelu morfinové senzitivace u potkanů. V této době bylo předpokládáno, že akumulace endokanabinoidů se může projevit v post mortem analýzách obsahu mozkové tkáně (Patel et al 2005). Caille a kol. (Caille et al 2007) používal *in vivo* mikrodialýzu NACSh během intravenózní self-administrace heroinu (IVSA). U potkanů ale neobjevil žádné rozdíly ve změnách koncentrací u AEA a 2-AG jak u naivních potkanů, tak ale ani u potkanů s předchozí zkušeností s heroinovou IVSA. Tato rozdílná zjištění naznačují, že opakované nepodmíněné podávání dávky drogy má vliv na koncentrace endokanabinoidů v mozku, které jsou ale nejspíš odlišné od těch, které vyvolává denní omezený přístup pomocí IVSA. Zde však mohou být brány v potaz rovněž možné rozdílnosti v účinku látek heroinu a morfinu (Andersen et al 2009). Nicméně námi pozorované morfinem indukované účinky v NACSh během fáze abstinence byly v souladu s pozorováním Caille et al. (Caille et al 2007), který popsal zvýšení koncentrace AEA a snížení koncentrace 2-AG během IVSA heroinu.

Premedikace antagonistou GHS-R1A dvacet minut před podáním dávky morfinu vyvolala významné změny v koncentracích AEA a 2-AG ve struktuře NACSh ve všech akutních a sub-chronických experimentech. Efekt zvýšení koncentrace AEA vyvolaný podáním morfinu byl úplně a na dávce závisle obrácen pomocí premedikace JMV2959, což vedlo k statisticky významnému poklesu koncentrace AEA jak u akutního, tak sub-chronického experimentu. Proti tomu efekt snížení koncentrace 2-AG vyvolaný podáním dávky morfinu byl prohlouben v akutním experimentu a mírně, avšak statisticky významně redukován v experimentu sub-chronickém. Podání látky JMV2959 ovlivnilo změny koncentrací endokanabinoidů vyvolané podáním morfinu různými způsoby: obrácením v případě AEA a zvýšením (v akutním) nebo snížením (v sub-chronickém) experimentu v případě 2-AG. V naší předchozí studii významně zvýšilo jednorázové podání agonisty GHS-R1A (ghrelin) v dávce 40 µg / kg jak

koncentrace AEA tak i 2-AG, společně s projevy stereotypního ohlodávání a lokomoce. Současné podání ghrelinu s JMV2959 3 mg / kg zcela kompletně vyrušilo sledované účinky tohoto GHS-R1A antagonisty na změny vyvolané morfinem. Tímto je účast ghrelinové signalizace na morfinem vyvolaných změnách koncentrace 2-AG a zvláště pak AEA v NACSh jasně prokázána. V minulosti bylo naznačováno, že se opioidy vyvolaný vzestup koncentrace AEA v NACSh zřejmě podílí na posilování závislosti na opioidech prostřednictvím CB1 receptory zprostředkovaného, a na dopaminu nezávislého, mechanismu (Caille et al 2007, Caille & Parsons 2003, Caille & Parsons 2006). Tudíž by pozorované obrácení na dávce závislého zvýšení koncentrace AEA, které bylo způsobeno podáním ghrelinového antagonisty, mohlo znamenat významnou roli ghrelinového signalizačního mechanismu v předpokládané účasti AEA jako jednoho z posilujících mechanismů při závislosti na opioidech. Posilující vlastnosti AEA byly v minulosti již potvrzeny metodou IVSA v experimentu na primátech {kotul veverovitý (Justinova et al 2005)}.

#### **5.4 Vliv podání JMV2959 na změny chování (Sustkova-Fiserova et al 2014, Sustkova-Fiserova et al 2016)**

Přecitlivělost mezolimbických dopaminergních neuronů během prodloužené abstinence může být podkladem pro dlouhodobé vyjádření behaviorální senzitivace během zneužívání, ale stejně tak jako obnovení kompulzivního chování při vyhledávání návykových látek (Robinson & Berridge 1993, Vanderschuren & Kalivas 2000). Mezolimbický dopaminergní systém zprostředkovává stimulačně-motivační a senzibilizující vlastnosti opioidů a dalších zneužívaných látek (De Vries et al 2003, De Vries et al 1998, Robinson & Berridge 2003, Steketee & Kalivas 2011, Vanderschuren & Kalivas 2000). Zásahy, které snižují dopaminergní a behaviorální senzibilizaci návykových látek / opioidů, mohou mít význam pro konceptualizaci a možnou léčbu závislosti (Steketee & Kalivas 2011, Vanderschuren & Kalivas 2000). Metoda

behaviorální senzitivace může být, s určitým omezením, použita pro výzkum motivace během fáze vyhledávání návykových látek.

#### **5.4.1 Ad výsledky obsažené v publikaci Sustkova-Fiserova et al 2014 – pozorované změny v chování vyjádřené v procentech**

Behaviorální data získaná během experimentu zobrazují typický bifázický účinek morfinu (inhibičně-stimulační), který koresponduje s literárními daty a našimi předchozími studiemi (Fiserova et al 1999). U morfinem indukovaných změn v chování se předpokládá, že odrážejí aktivitu v mesostriálním dopaminergním systému. Behaviorální stimulace, zahrnující stereotypní chování (ohlodávání, olizování a stereotypní očichávání) je považována za znak aktivace nigrostriální dráhy (Koob & Volkow 2010, Wise & Bozarth 1987). Premedikace JMV2959 významně a na dávce závisle (rovněž u dávky JMV29596 mg / kg) snížila příznaky stereotypního chování (významně u stereotypního očichávání a ohlodávání) a zcela potlačila projevy olizování u obou podaných koncentrací morfinu. Výše zmíněné naznačuje zapojení ghrelinového signálního mechanismu v některých morfinem indukovaných změnách, které jsou považovány za znaky striální dopaminergní aktivace.

#### **5.4.2 Ad výsledky obsažené v publikaci Sustkova-Fiserova et al 2016 – pozorované změny v chování podle kategorií**

Bylo pozorováno, že podání JMV2959 v naší studii redukovalo zvýšenou lokomoční aktivitu a projevy stereotypního chování (zejména příznaky stereotypního olizování, ohlodávání a očichávání) vyvolané morfinem v experimentu s akutním i sub-chronickým podáním. Souběžným podáváním ghrelinu bylo také potvrzeno zapojení ghrelinového systému. Také tyto výsledky naznačují, že ghrelinová signalizace může úzce souviset s opioidní závislostí, podobně jako bylo zjištěno ve studiích zkoumajících vliv ethanolu a psychostimulantů, ve kterých ghrelinový antagonismus zvýšil nebo eliminoval behaviorální stimulaci (Jerlhag et al 2010, Jerlhag & Engel 2011, Jerlhag et al 2011, Wellman et al 2011) a senzitivaci (Abizaid et al 2011, Wellman et al 2013) indukovanou podáním těchto látek. Pozoruhodný nálezn byl učiněn zjištěním, že

neuronální okruhy zodpovědné za senzitivaci a návrat k droze se překrývají (De Vries et al 1998, Robinson & Berridge 2003, Steketee & Kalivas 2011). V minulosti byla popsána křížová senzitivace mezi opioidy a kanabinoidy (Cadoni et al 2001, Pontieri et al 2001a, Pontieri et al 2001b, Singh et al 2005). Jak antagonist receptoru CB1, látka SR141716A, tak antagonist opioidního receptoru naloxon zablokovali behaviorální křížovou senzitivaci, což naznačuje, že endokanabinoidní ale i endorfinová mediace hraje podstatnou roli během odpovědi na opioidy nebo kanabinoidy. Vigano a kol. (Vigano et al 2004) zjistil, že látka SR141716A dokázala redukovat expresi, ale ne indukční fázi behaviorální senzitivace a že koncentrace endokanabinoidů AEA a 2-AG byly rozdílně významně ovlivněny během obou fází morfinové senzitivace. Přesná úloha endokanabinoidů v průběhu behaviorální senzitivace (včetně opioidní senzitivace) však zůstává neobjasněná.

## **5.5 Vliv podání JMV2959 na morfinem navozenou behaviorální senzitivaci (Sustkova-Fiserova et al 2016) a (Jerabek et al 2017)**

### **5.5.1 Ad výsledky obsažené v publikaci Sustkova-Fiserova et al 2016**

Podání JMV2959 v naší studii redukovalo projevy morfinové behaviorální senzitivace, zvýšenou lokomoční aktivitu a projevy stereotypního chování (zejména příznaky stereotypního olizování, žvýkání a čenichání) výrazněji než u akutního podání morfinu. Také tyto výsledky dále dokládají, že ghrelinová signalizace se výrazně uplatňuje v mechanismech opioidní závislosti, podobně jak to bylo zjištěno ve studiích s behaviorální senzitivací indukovanou podáním etanolu, kokainu a nikotinu (Abizaid et al 2011, Wellman et al 2013).

Bylo zjištěno, že neuronální okruhy zodpovědné za senzitivaci a návrat k droze se překrývají (De Vries et al 1998, Robinson & Berridge 2003, Steketee & Kalivas 2011). V minulosti byla popsána zkřížená senzitivace mezi opioidy a kanabinoidy (Cadoni et al 2001, Pontieri et al 2001a, Pontieri et al 2001b, Singh et al 2005). Jak antagonist receptoru CB1, látka SR141716A, tak antagonist opioidního receptoru naloxon zablokovali behaviorální zkříženou senzitivaci, což naznačuje, že



endokanabinoidní ale i endorfinová mediace hrají podstatnou roli v efektech opioidů a kanabinoidů. Vigano a kol. (Vigano et al 2004) zjistil, že látka SR141716A dokázala redukovat expresi, ale ne indukční fázi behaviorální senzitivace a že koncentrace endokanabinoidů AEA a 2-AG byly rozdílným způsobem ovlivněny během obou fází morfinové senzitivace. Přesná úloha endokanabinoidů v průběhu behaviorální senzitivace (včetně opioidní senzitivace) však zůstává neobjasněná.

Pozorované snížení morfinem navozené behaviorální senzitivace premedikací ghreliným antagonistou spolu s již uvedeným útlumem dopaminergní senzitivace dokládá významnou roli GHS-R1A mechanismů v opioidní závislosti a podporuje další adiktologický výzkum.

### **5.5.2 Ad výsledky obsažené v publikaci Jerabek et al 2017**

Ve čtyřech sledovaných hlavních kategoriích chování (stereotypie, lokomoce, katalepsie, nehybnost), premedikace JMV2959 výrazně snížila morfinovou senzibilizací způsobené projevy stereotypie a lokomoce, společně s proporcí zvýšenými projevy nehybnosti. Tyto výsledky jsou ve shodě s našimi předešlými studiemi, kde byla účast ghrelinového systému u opioidy vyvolaných projevů stereotypie a u zvýšených projevů lokomoce, potvrzena souběžným podáváním ghreluinu během akutního experimentu (Sustkova-Fiserova et al 2016). Křížová senzitivace mezi ghrelinem a kokainem byla již v minulosti popsána v experimentu u potkanů (Wellman et al 2008). Farmakologická inaktivace GHS-R1A (podáním JMV2959, nebo použitím knockoutovaných zvířat) byla již v minulosti popsána jako účinná pro zmírnění behaviorálních stavů při senzitivaci na nikotin (Wellman et al 2011), kokain (Abizaid et al 2011, Clifford et al 2012) a etanol (Bahi et al 2013). Naše výsledky tedy nyní naznačují vliv ghrelinových mechanismů na behaviorálně senzibilizační proces vyvolaný podáním opioidů.

## **5.6 Vliv podání JMV2959 na ovlivnění spontánní aktivity potkanů (Jerabek et al 2017)**

Při sledování explorační aktivity potkanů v otevřeném poli během 20 minut počínaje 25. minutou po aplikaci intraperitoneální aplikaci JMV2959 v dávkách 1 nebo 3 nebo 6 mg/kg nebo fyziologického roztoku jsem ověřili (pomocí metody Ethovision), že tento ghrelinový antagonist v experimentech užívaných dávkách významně neovlivňuje motoriku zvířat, což je v souladu s literaturou (Clifford et al 2012, Jerlhag et al 2010). V našich mikrodialyzačních studiích jsem pozorovali zhruba u 40% zvířat pouze po aplikaci JMV2959 v nejvyšší dávce 6 mg/kg přechodné změny v chování zvířat – útlum a protahování zadních končetin, tyto příznaky spontánně vymizely během prvního dvaceti minutového intervalu po aplikaci JMV2959 (Jerabek et al 2017, Sustkova-Fiserova et al 2016).

## **5.7 Vliv podání JMV2959 na ovlivnění drogou podmíněné preference místa (Jerabek et al 2017)**

Metoda CPP poskytuje jedinečné informace o účincích odměny spojené s kontextuálními podněty (Bardo & Bevins 2000), které zahrnují posilující účinky drog, včetně opioidů (Bals-Kubik et al 1993, Shippenberg et al 1993). Společným podáváním ghreluinu bylo v experimentu u potkanů (Davis et al 2007) pozorováno zvýšení CPP indukované kokainem. Ať už genetické či farmakologické potlačení GHS-R1A za použití ghrelinově knock-outovaných myši, nebo premedikace JMV2959, snížily CPP způsobené podáním ethanolu (Bahi et al 2013, Jerlhag et al 2009), nikotinu (Jerlhag & Engel 2011), kokainu (Abizaid et al 2011, Jerlhag et al 2010), amfetaminu (Jerlhag et al 2010) a morfinu (Engel et al 2015). V naší studii byla podáním JMV2959 v koncentraci 3 a 6 mg / kg významně a na dávce závisle snížena morfinem vyvolaná CPP u potkanů. Toto pozorování poukazuje na účast signalizačních mechanismů ghreluinu při odměňovacích procesech u podání opioidů a zároveň naznačuje, že

ghrelinový antagonismus dokáže významně oslabit odměňovací efekt morfinu. Samotné podání dávky JMV2959 v koncentraci 1, 3 a 6 mg / kg významně neovlivnilo pohybovou aktivitu potkanů 25 minut po podání JMV2959. Výše uvedené výsledky podporují další výzkum antagonismu ghrelinu jako potenciální nové strategie pro terapii závislosti na opioidech.

## 6. Závěr

Lze shrnout, že náš dosavadní výzkum podporuje představu potenciálního využití ghrelinového antagonizmu v léčbě opioidní závislosti. Bylo ověřeno, že aplikace antagonisty GHS-R1A významně snížila vyplavení dopaminu v nucleus accumbens shell (NACSh) vyvolané akutním podáním opioidu (morfinu) a současně zredukovala výskyt opioidních stereotypních prvků v chování potkanů (Sustkova-Fiserova et al 2014). Ghrelinový antagonismus také významně ztlumil dopaminergní senzitivitu v NAC i paralelní behaviorální senzitivitu vyvolanou podáním morfinu během abstinence (Jerabek et al 2017). V akutním i sub-chronickém experimentu premedikace JMV2959 také významně ovlivnila tvorbu metabolitů dopaminu, která je podáním opioidů zvýšená. Antagonista GHS-R1A zvrátil nárůst koncentrace endokanabinoidu anandamidu (arachidonylethanolamin, AEA) v NAC vyvolaný opioidem (morfinem) v akutních dávkách i v provokačních dávkách během abstinence (Sustkova-Fiserova et al 2016). Zvýšené extracelulární koncentrace dopaminu i anandamidu v NAC vyvolané podáním opioidu jsou součástí předpokládaných opioidních závislostních mechanismů. Dále jsme prokázali, že premedikace JMV2959 významně snížila expresi morfinem podmíněné preference prostředí (CPP), což svědčí o schopnosti ghrelinového antagonizmu ztlumit vyhledávání prostředí spojeného s aplikací drogy, tedy ztlumit projevy žádostivosti po droze (craving) (Jerabek et al 2017).

Tyto naše prezentované neurochemické a behaviorální výsledky dokládají významné zapojení ghrelinového signálního mechanismu v morfinem resp.

opioidy indukovaných změnách v mezolimbickém dopaminergním systému, které jsou spojeny s procesy neurální odměny. Zároveň jsme zjistili, že ghrelin, resp. GHS-R1A se významně podílí i na endokanabinoidních (anandamid, 2-AG) odměňovacích mechanismech opioidů v NAC při akutním podání i u aplikace provokační dávky morfinu po 10 – 12ti denní abstinenci. Takže centrální ghrelinová signalizace se pravděpodobně významně podílí nejen na dopaminergních ale i na dopaminu nezávislých odměňovacích a posilovacích mechanismech opioidů. Naše výsledky tak podporují další (i náš vlastní) výzkum ve směru možnosti využití ghrelinového antagonizmu v terapii opioidní závislosti, např. za pomoci animálních specifických modelů závislosti, jako je intravenózní self-administrace (IVSA), atp.

## 7. Seznam použité literatury

- Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, et al. 2006. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest* 116: 3229-39
- Abizaid A, Mineur YS, Roth RH, Elsworth JD, Sleeman MW, et al. 2011. Reduced locomotor responses to cocaine in ghrelin-deficient mice. *Neuroscience* 192: 500-6
- Acquas E, Di Chiara G. 1992. Depression of mesolimbic dopamine transmission and sensitization to morphine during opiate abstinence. *J Neurochem* 58: 1620-5
- Addolorato G, Capristo E, Leggio L, Ferrulli A, Abenavoli L, et al. 2006. Relationship between ghrelin levels, alcohol craving, and nutritional status in current alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 30: 1933-7
- Airio J, Attila M, Leikola-Pelho T, Ahtee L. 1994. Withdrawal from repeated morphine sensitizes mice to the striatal dopamine release enhancing effect of acute morphine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 350: 548-54
- Al-Massadi O, Gabellieri E, Trujillo ML, Senaris R, Pagotto U, et al. 2010. Peripheral endocannabinoid system-mediated actions of rimonabant on growth hormone secretion are ghrelin-dependent. *J Neuroendocrinol* 22: 1127-36
- Alheid GF. 2003. Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci* 985: 185-205
- Anderberg RH, Hansson C, Fenander M, Richard JE, Dickson SL, et al. 2016. The Stomach-Derived Hormone Ghrelin Increases Impulsive Behavior. *Neuropsychopharmacology* 41: 1199-209

- Andersen JM, Ripel A, Boix F, Normann PT, Morland J. 2009. Increased locomotor activity induced by heroin in mice: pharmacokinetic demonstration of heroin acting as a prodrug for the mediator 6-monoacetylmorphine in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 331: 153-61
- Arnold M, Mura A, Langhans W, Geary N. 2006. Gut vagal afferents are not necessary for the eating-stimulatory effect of intraperitoneally injected ghrelin in the rat. *J Neurosci* 26: 11052-60
- Attila LM, Ahtee L. 1984. Retardation of cerebral dopamine turnover after morphine withdrawal and its enhanced acceleration by acute morphine administration in rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 327: 201-7
- Bahi A, Tolle V, Fehrentz JA, Brunel L, Martinez J, et al. 2013. Ghrelin knockout mice show decreased voluntary alcohol consumption and reduced ethanol-induced conditioned place preference. *Peptides* 43: 48-55
- Baimel C, Bartlett SE, Chiou LC, Lawrence AJ, Muschamp JW, et al. 2015. Orexin/hypocretin role in reward: implications for opioid and other addictions. *Br J Pharmacol* 172: 334-48
- Bals-Kubik R, Ableitner A, Herz A, Shippenberg TS. 1993. Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 489-95
- Bardo MT, Bevins RA. 2000. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl)* 153: 31-43
- Barr AM, Phillips AG. 1999. Withdrawal following repeated exposure to d-amphetamine decreases responding for a sucrose solution as measured by a progressive ratio schedule of reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 141: 99-106
- Barrot M, Sesack SR, Georges F, Pistis M, Hong S, Jhou TC. 2012. Braking dopamine systems: a new GABA master structure for mesolimbic and nigrostriatal functions. *J Neurosci* 32: 14094-101
- Cadoni C, Di Chiara G. 1999. Reciprocal changes in dopamine responsiveness in the nucleus accumbens shell and core and in the dorsal caudate-putamen in rats sensitized to morphine. *Neuroscience* 90: 447-55
- Cadoni C, Pisanu A, Solinas M, Acquas E, Di Chiara G. 2001. Behavioural sensitization after repeated exposure to Delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. *Psychopharmacology (Berl)* 158: 259-66
- Caille S, Alvarez-Jaimes L, Polis I, Stouffer DG, Parsons LH. 2007. Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *J Neurosci* 27: 3695-702
- Caille S, Parsons LH. 2003. SR141716A reduces the reinforcing properties of heroin but not heroin-induced increases in nucleus accumbens dopamine in rats. *Eur J Neurosci* 18: 3145-9
- Caille S, Parsons LH. 2006. Cannabinoid modulation of opiate reinforcement through the ventral striatopallidal pathway. *Neuropsychopharmacology* 31: 804-13

- Carroll ME. 1998. Acquisition and reacquisition (relapse) of drug abuse: modulation by alternative reinforcers. *NIDA Res Monogr* 169: 6-25
- Carroll ME, Lac ST. 1998. Dietary additives and the acquisition of cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 137: 81-9
- Carter LP, Griffiths RR. 2009. Principles of laboratory assessment of drug abuse liability and implications for clinical development. *Drug Alcohol Depend* 105 Suppl 1: S14-25
- Chefer VI, Thompson AC, Zapata A, Shippenberg TS. 2009. Overview of brain microdialysis. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 7: Unit7 1
- Clifford PS, Rodriguez J, Schul D, Hughes S, Kniffin T, et al. 2012. Attenuation of cocaine-induced locomotor sensitization in rats sustaining genetic or pharmacologic antagonism of ghrelin receptors. *Addict Biol* 17: 956-63
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, et al. 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37: 649-61
- Crews FT, Vetreno RP. 2011. Addiction, adolescence, and innate immune gene induction. *Front Psychiatry* 2: 19
- Crow TJ. 1973. Catecholamine-containing neurones and electrical self-stimulation. 2. A theoretical interpretation and some psychiatric implications. *Psychol Med* 3: 66-73
- Crowley WR, Ramoz G, Keefe KA, Torto R, Kalra SP, Hanson GR. 2005. Differential effects of methamphetamine on expression of neuropeptide Y mRNA in hypothalamus and on serum leptin and ghrelin concentrations in ad libitum-fed and schedule-fed rats. *Neuroscience* 132: 167-73
- Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, et al. 2002. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med* 8: 643-4
- Cummings DE, Naleid AM, Figlewicz Lattemann DP. 2007. Ghrelin: a link between energy homeostasis and drug abuse? *Addict Biol* 12: 1-5
- Darvesh AS, Carroll RT, Geldenhuys WJ, Gudelsky GA, Klein J, et al. 2011. In vivo brain microdialysis: advances in neuropsychopharmacology and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 6: 109-27
- Davis C, Carter JC. 2009. Compulsive overeating as an addiction disorder. A review of theory and evidence. *Appetite* 53: 1-8
- Davis KW, Wellman PJ, Clifford PS. 2007. Augmented cocaine conditioned place preference in rats pretreated with systemic ghrelin. *Regul Pept* 140: 148-52
- De Vries TJ, Homberg JR, Binnekade R, Raaso H, Schoffeleer ANM. 2003. Cannabinoid modulation of the reinforcing and motivational properties of heroin and heroin-associated cues in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 168: 164-69
- De Vries TJ, Schoffeleer AN, Binnekade R, Mulder AH, Vanderschuren LJ. 1998. Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. *Eur J Neurosci* 10: 3565-71

- Di Chiara G. 2002. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* 137: 75-114
- Doyle TG, Berridge KC, Gosnell BA. 1993. Morphine enhances hedonic taste palatability in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 46: 745-9
- Egecioglu E, Jerlhag E, Salome N, Skibicka KP, Haage D, et al. 2010. Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. *Addict Biol* 15: 304-11
- Engel JA, Jerlhag E. 2014. Role of appetite-regulating peptides in the pathophysiology of addiction: implications for pharmacotherapy. *CNS Drugs* 28: 875-86
- Engel JA, Nylander I, Jerlhag E. 2015. A ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonist attenuates the rewarding properties of morphine and increases opioid peptide levels in reward areas in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 25: 2364-71
- Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, et al. 1996. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett* 393: 231-5
- Fišerová M. 2000. Historie, příčiny a léčení drogových závislostí. *Postgraduální medicína* 2: 288-98
- Fiserova M, Consolo S, Krsiak M. 1999. Chronic morphine induces long-lasting changes in acetylcholine release in rat nucleus accumbens core and shell: an in vivo microdialysis study. *Psychopharmacology (Berl)* 142: 85-94
- Fowler JS, Volkow ND, Logan J, Alexoff D, Telang F, et al. 2008. Fast uptake and long-lasting binding of methamphetamine in the human brain: comparison with cocaine. *Neuroimage* 43: 756-63
- Gardner EL. 2005. Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 263-84
- Gardner EL. 2008. Use of animal models to develop antiaddiction medications. *Curr Psychiatry Rep* 10: 377-84
- Grigson PS. 2002. Like drugs for chocolate: separate rewards modulated by common mechanisms? *Physiol Behav* 76: 389-95
- Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, et al. 1997. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48: 23-9
- Heimer L, Alheid GF. 1991. Piecing together the puzzle of basal forebrain anatomy. *Adv Exp Med Biol* 295: 1-42
- Hernandez G, Hamdani S, Rajabi H, Conover K, Stewart J, et al. 2006. Prolonged rewarding stimulation of the rat medial forebrain bundle: neurochemical and behavioral consequences. *Behav Neurosci* 120: 888-904
- Hirth N, Meinhardt MW, Noori HR, Salgado H, Torres-Ramirez O, et al. 2016. Convergent evidence from alcohol-dependent humans and rats for a hyperdopaminergic state in protracted abstinence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 3024-9

- Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. 2003. High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol* 17: 2201-10
- Holst B, Schwartz TW. 2004. Constitutive ghrelin receptor activity as a signaling set-point in appetite regulation. *Trends Pharmacol Sci* 25: 113-7
- Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. 2000. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 909-13
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. 2006. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29: 565-98
- Jerabek P, Havlickova T, Puskina N, Charalambous C, Lapka M, et al. 2017. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced conditioned place preference and behavioral and accumbens dopaminergic sensitization in rats. *Neurochem Int* 110: 101-13
- Jerlhag E, Egecioglu E, Dickson SL, Andersson M, Svensson L, Engel JA. 2006. Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addict Biol* 11: 45-54
- Jerlhag E, Egecioglu E, Dickson SL, Douhan A, Svensson L, Engel JA. 2007. Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. *Addict Biol* 12: 6-16
- Jerlhag E, Egecioglu E, Dickson SL, Engel JA. 2010. Ghrelin receptor antagonism attenuates cocaine- and amphetamine-induced locomotor stimulation, accumbal dopamine release, and conditioned place preference. *Psychopharmacology (Berl)* 211: 415-22
- Jerlhag E, Egecioglu E, Dickson SL, Svensson L, Engel JA. 2008. Alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are involved in mediating the ghrelin-induced locomotor stimulation and dopamine overflow in nucleus accumbens. *Eur Neuropsychopharmacol* 18: 508-18
- Jerlhag E, Egecioglu E, Landgren S, Salome N, Heilig M, et al. 2009. Requirement of central ghrelin signaling for alcohol reward. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11318-23
- Jerlhag E, Engel JA. 2011. Ghrelin receptor antagonism attenuates nicotine-induced locomotor stimulation, accumbal dopamine release and conditioned place preference in mice. *Drug Alcohol Depend* 117: 126-31
- Jerlhag E, Janson AC, Waters S, Engel JA. 2012. Concomitant release of ventral tegmental acetylcholine and accumbal dopamine by ghrelin in rats. *PLoS One* 7: e49557
- Jerlhag E, Landgren S, Egecioglu E, Dickson SL, Engel JA. 2011. The alcohol-induced locomotor stimulation and accumbal dopamine release is suppressed in ghrelin knockout mice. *Alcohol* 45: 341-7



- Justinova Z, Solinas M, Tanda G, Redhi GH, Goldberg SR. 2005. The endogenous cannabinoid anandamide and its synthetic analog R(+)-methanandamide are intravenously self-administered by squirrel monkeys. *J Neurosci* 25: 5645-50
- Kalina K. 2015. *Klinická adiktologie*. Grada Publishing, a.s.
- Kalivas PW, Duffy P, White SR. 1998. MDMA elicits behavioral and neurochemical sensitization in rats. *Neuropsychopharmacology* 18: 469-79
- Kalivas PW, O'Brien C. 2008. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33: 166-80
- Kaur S, Ryabinin AE. 2010. Ghrelin receptor antagonism decreases alcohol consumption and activation of perilocomotor urocortin-containing neurons. *Alcohol Clin Exp Res* 34: 1525-34
- Kenny PJ. 2011. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nat Rev Neurosci* 12: 638-51
- Kirkham TC. 2005. Endocannabinoids in the regulation of appetite and body weight. *Behav Pharmacol* 16: 297-313
- Kirkham TC, Williams CM. 2001. Endogenous cannabinoids and appetite. *Nutr Res Rev* 14: 65-86
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-60
- Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K. 2001. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* 12: 118-22
- Kojima M, Kangawa K. 2006. Drug insight: The functions of ghrelin and its potential as a multitier therapeutic hormone. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2: 80-8
- Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, et al. 2005. Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280: 25196-201
- Koob GF. 1992. Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* 654: 171-91
- Koob GF. 2009. Neurobiological substrates for the dark side of compulsivity in addiction. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1: 18-31
- Koob GF, Le Moal M. 1997. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278: 52-8
- Koob GF, Le Moal M. 2008. Addiction and the brain antireward system. *Annu Rev Psychol* 59: 29-53
- Koob GF, Volkow ND. 2010. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35: 217-38
- Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, et al. 2001. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 881-7

- Kornetsky C, Esposito RU. 1979. Euphorigenic drugs: effects on the reward pathways of the brain. *Fed Proc* 38: 2473-6
- Kuczenski R, Segal DS. 1999. Dynamic changes in sensitivity occur during the acute response to cocaine and methylphenidate. *Psychopharmacology (Berl)* 147: 96-103
- Landgren S, Simms JA, Hyytia P, Engel JA, Bartlett SE, Jerlhag E. 2012. Ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonism suppresses both operant alcohol self-administration and high alcohol consumption in rats. *Addict Biol* 17: 86-94
- Lee MR, Tapocik JD, Ghareeb M, Schwandt ML, Dias AA, et al. 2018. The novel ghrelin receptor inverse agonist PF-5190457 administered with alcohol: preclinical safety experiments and a phase 1b human laboratory study. *Mol Psychiatry*
- Leone P, Pocock D, Wise RA. 1991. Morphine-dopamine interaction: ventral tegmental morphine increases nucleus accumbens dopamine release. *Pharmacol Biochem Behav* 39: 469-72
- Lister RG. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92: 180-5
- Liu Y, Le Foll B, Liu Y, Wang X, Lu L. 2008. Conditioned place preference induced by licit drugs: establishment, extinction, and reinstatement. *ScientificWorldJournal* 8: 1228-45
- Lynch WJ, Nicholson KL, Dance ME, Morgan RW, Foley PL. 2010. Animal models of substance abuse and addiction: implications for science, animal welfare, and society. *Comp Med* 60: 177-88
- Mackey WB, van der Kooy D. 1985. Neuroleptics block the positive reinforcing effects of amphetamine but not of morphine as measured by place conditioning. *Pharmacol Biochem Behav* 22: 101-5
- Maric T, Sedki F, Ronfard B, Chafetz D, Shalev U. 2012. A limited role for ghrelin in heroin self-administration and food deprivation-induced reinstatement of heroin seeking in rats. *Addict Biol* 17: 613-22
- McFarland K, Kalivas PW. 2001. The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci* 21: 8655-63
- Mello NK, Negus SS. 1996. Preclinical evaluation of pharmacotherapies for treatment of cocaine and opioid abuse using drug self-administration procedures. *Neuropsychopharmacology* 14: 375-424
- Moulin A, Demange L, Berge G, Gagne D, Ryan J, et al. 2007. Toward potent ghrelin receptor ligands based on trisubstituted 1,2,4-triazole structure. 2. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations. *J Med Chem* 50: 5790-806
- Mravčík V. 2016. Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2015, Národní monitorovací středisko pro drogy a závislosti, Úřad vlády české Republiky, 2016
- Mucha RF, Herz A. 1986. Preference conditioning produced by opioid active and inactive isomers of levorphanol and morphine in rat. *Life Sci* 38: 241-9

- Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Date Y, Nakazato M, et al. 2001. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation* 104: 2034-8
- Nakagawa T, Suzuki Y, Nagayasu K, Kitaichi M, Shirakawa H, Kaneko S. 2011. Repeated exposure to methamphetamine, cocaine or morphine induces augmentation of dopamine release in rat mesocorticolimbic slice co-cultures. *PLoS One* 6: e24865
- Naleid AM, Grace MK, Cummings DE, Levine AS. 2005. Ghrelin induces feeding in the mesolimbic reward pathway between the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Peptides* 26: 2274-9
- Narayanan NS, Guarnieri DJ, DiLeone RJ. 2010. Metabolic hormones, dopamine circuits, and feeding. *Front Neuroendocrinol* 31: 104-12
- Navarro M, Carrera MR, Fratta W, Valverde O, Cossu G, et al. 2001. Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. *J Neurosci* 21: 5344-50
- Nešpor K. 2002. Závislost na návykových látkách a související poruchy. Doporučené postupy pro praktické lékaře.
- Nestler EJ. 2005. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8: 1445-9
- Olds J, Milner P. 1954. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47: 419-27
- Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, et al. 2001. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 145: 669-73
- Panagopoulos VN, Ralevski E. 2014. The role of ghrelin in addiction: a review. *Psychopharmacology (Berl)* 231: 2725-40
- Patel S, Carrier EJ, Ho WS, Rademacher DJ, Cunningham S, et al. 2005. The postmortal accumulation of brain N-arachidonylethanolamine (anandamide) is dependent upon fatty acid amide hydrolase activity. *J Lipid Res* 46: 342-9
- Paxinos G, Watson, C. 2006. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, sixth ed.*: Academic Press/Elsevier, Amsterdam.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14: 149-67
- Planeta CS. 2013. Animal models of alcohol and drug dependence. *Rev Bras Psiquiatr* 35 Suppl 2: S140-6
- Pontieri FE, Monnazzi P, Scontrini A, Buttarelli FR, Patacchioli FR. 2001a. Behavioral sensitization to heroin by cannabinoid pretreatment in the rat. *Eur J Pharmacol* 421: R1-3
- Pontieri FE, Monnazzi P, Scontrini A, Buttarelli FR, Patacchioli FR. 2001b. Behavioral sensitization to WIN55212.2 in rats pretreated with heroin. *Brain Res* 898: 178-80

- Pothos E, Rada P, Mark GP, Hoebel BG. 1991. Dopamine microdialysis in the nucleus accumbens during acute and chronic morphine, naloxone-precipitated withdrawal and clonidine treatment. *Brain Res* 566: 348-50
- Prus AJ, James JR, Rosecrans JA. 2009. Conditioned Place Preference In *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, ed. nd, JJ Buccafusco. Boca Raton (FL)
- Prut L, Belzung C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463: 3-33
- Pushkina N, Šustková-Fišerová, M. 2014. Pre-clinical addiction research: Selected methods. *Adiktologie* 14(3): 264-83
- Quarta D, Di Francesco C, Melotto S, Mangiarini L, Heidbreder C, Hedou G. 2009. Systemic administration of ghrelin increases extracellular dopamine in the shell but not the core subdivision of the nucleus accumbens. *Neurochem Int* 54: 89-94
- Rada P, Mark GP, Pothos E, Hoebel BG. 1991. Systemic morphine simultaneously decreases extracellular acetylcholine and increases dopamine in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuropharmacology* 30: 1133-6
- Rada PV, Mark GP, Yeomans JJ, Hoebel BG. 2000. Acetylcholine release in ventral tegmental area by hypothalamic self-stimulation, eating, and drinking. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 375-9
- Robinson TE, Berridge KC. 1993. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18: 247-91
- Robinson TE, Berridge KC. 2003. Addiction. *Annu Rev Psychol* 54: 25-53
- Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, et al. 2002. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3997-4000
- Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, et al. 2002. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 23: 531-6
- Sanchis-Segura C, Spanagel R. 2006. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 11: 2-38
- Schultz W. 2007. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* 30: 259-88
- Shippenberg TS, Bals-Kubik R, Herz A. 1993. Examination of the neurochemical substrates mediating the motivational effects of opioids: role of the mesolimbic dopamine system and D-1 vs. D-2 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 53-9
- Singh ME, McGregor IS, Mallet PE. 2005. Repeated exposure to Delta(9)-tetrahydrocannabinol alters heroin-induced locomotor sensitisation and Fos-immunoreactivity. *Neuropharmacology* 49: 1189-200
- Sinha R, Jastreboff AM. 2013. Stress as a common risk factor for obesity and addiction. *Biol Psychiatry* 73: 827-35
- Skibicka KP, Dickson SL. 2011. Ghrelin and food reward: the story of potential underlying substrates. *Peptides* 32: 2265-73

- Solinas M, Panlilio LV, Antoniou K, Pappas LA, Goldberg SR. 2003. The cannabinoid CB1 antagonist N-piperidinyl-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methylpyrazole-3-carboxamide (SR-141716A) differentially alters the reinforcing effects of heroin under continuous reinforcement, fixed ratio, and progressive ratio schedules of drug self-administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 93-102
- Spanagel R. 2009. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* 89: 649-705
- Spanagel R, Almeida OF, Shippenberg TS. 1993. Long lasting changes in morphine-induced mesolimbic dopamine release after chronic morphine exposure. *Synapse* 14: 243-5
- Steketee JD, Kalivas PW. 2011. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Rev* 63: 348-65
- Stolerman IP, Childs E, Ford MM, Grant KA. 2011. Role of training dose in drug discrimination: a review. *Behav Pharmacol* 22: 415-29
- Suchankova P, Steensland P, Fredriksson I, Engel JA, Jerlhag E. 2013. Ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonism suppresses both alcohol consumption and the alcohol deprivation effect in rats following long-term voluntary alcohol consumption. *PLoS One* 8: e71284
- Sustkova-Fiserova M, Jerabek P, Havlickova T, Kacer P, Krsiak M. 2014. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced accumbens dopamine release and behavioral stimulation in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 231: 2899-908
- Sustkova-Fiserova M, Jerabek P, Havlickova T, Syslova K, Kacer P. 2016. Ghrelin and endocannabinoids participation in morphine-induced effects in the rat nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 233: 469-84
- Šustková M. 2003. Neurobiologie drogových závislostí In Kalina, K & Radimecký, J (Eds.) *Drogy a drogové závislosti: mezioborový přístup I a II.*: Praha: Úřad vlády ČR
- Šustková M. 2015. 6. Neurobiologie závislostí In Kalina, K a kol.: *Klinická adiktologie 1. vyd.*, pp. 140-71: Praha: Grada Publ.
- Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G. 1997. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science* 276: 2048-50
- Tang Dea. 2011. *Administration of ghrelin increases willingness to pay for food: a neuroeconomics approach to obesity.* Presented at Meeting: Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: Obesity., Keystone resort, CO, USA.
- Tessari M, Catalano A, Pellitteri M, Di Francesco C, Marini F, et al. 2007. Correlation between serum ghrelin levels and cocaine-seeking behaviour triggered by cocaine-associated conditioned stimuli in rats. *Addict Biol* 12: 22-9

- Tiffany ST, Carter BL, Singleton EG. 2000. Challenges in the manipulation, assessment and interpretation of craving relevant variables. *Addiction* 95 Suppl 2: S177-87
- Tomoda K, Kubo K, Nishii Y, Yamamoto Y, Yoshikawa M, Kimura H. 2012. Changes of ghrelin and leptin levels in plasma by cigarette smoke in rats. *J Toxicol Sci* 37: 131-8
- Torregrossa MM, Kalivas PW. 2008. Microdialysis and the neurochemistry of addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 90: 261-72
- Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, et al. 2001. Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 1220-5
- Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407: 908-13
- Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, et al. 2001. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24: RC19-21
- Urstadt KR, Coop SH, Banuelos BD, Stanley BG. 2013a. Behaviorally specific versus non-specific suppression of accumbens shell-mediated feeding by ipsilateral versus bilateral inhibition of the lateral hypothalamus. *Behav Brain Res* 257: 230-41
- Urstadt KR, Kally P, Zaidi SF, Stanley BG. 2013b. Ipsilateral feeding-specific circuits between the nucleus accumbens shell and the lateral hypothalamus: regulation by glutamate and GABA receptor subtypes. *Neuropharmacology* 67: 176-82
- van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E. 2004. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25: 426-57
- Vanderschuren LJ, Kalivas PW. 2000. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 151: 99-120
- Vezina P. 2004. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 827-39
- Vezina P. 2007. Sensitization, drug addiction and psychopathology in animals and humans. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 1553-5
- Vigano D, Valenti M, Cascio MG, Di Marzo V, Parolaro D, Rubino T. 2004. Changes in endocannabinoid levels in a rat model of behavioural sensitization to morphine. *Eur J Neurosci* 20: 1849-57
- Wang GJ, Volkow ND, Thanos PK, Fowler JS. 2004. Similarity between obesity and drug addiction as assessed by neurofunctional imaging: a concept review. *J Addict Dis* 23: 39-53

- Wellman PJ, Clifford PS, Rodriguez J, Hughes S, Eitan S, et al. 2011. Pharmacologic antagonism of ghrelin receptors attenuates development of nicotine induced locomotor sensitization in rats. *Regul Pept* 172: 77-80
- Wellman PJ, Clifford PS, Rodriguez JA. 2013. Ghrelin and ghrelin receptor modulation of psychostimulant action. *Front Neurosci* 7: 171
- Wellman PJ, Davis KW, Nation JR. 2005. Augmentation of cocaine hyperactivity in rats by systemic ghrelin. *Regul Pept* 125: 151-4
- Wellman PJ, Hollas CN, Elliott AE. 2008. Systemic ghrelin sensitizes cocaine-induced hyperlocomotion in rats. *Regul Pept* 146: 33-7
- Wise RA. 1978. Catecholamine theories of reward: a critical review. *Brain Res* 152: 215-47
- Wise RA. 2006. The parsing of food reward. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1234-5
- Wise RA, Bozarth MA. 1987. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94: 469-92
- Wiskerke J, Irimia C, Cravatt BF, De Vries TJ, Schoffelmeer AN, et al. 2012. Characterization of the effects of reuptake and hydrolysis inhibition on interstitial endocannabinoid levels in the brain: an in vivo microdialysis study. *ACS Chem Neurosci* 3: 407-17
- Wisse BE, Frayo RS, Schwartz MW, Cummings DE. 2001. Reversal of cancer anorexia by blockade of central melanocortin receptors in rats. *Endocrinology* 142: 3292-301
- Wolf ME. 2002. Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. *Mol Interv* 2: 146-57
- Wurst FM, Graf I, Ehrenthal HD, Klein S, Backhaus J, et al. 2007. Gender differences for ghrelin levels in alcohol-dependent patients and differences between alcoholics and healthy controls. *Alcohol Clin Exp Res* 31: 2006-11
- Zapata A, Chefer VI, Shippenberg TS. 2009. Microdialysis in rodents. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 7: Unit7 2
- Zheng D, Liu S, Cabeza de Vaca S, Carr KD. 2013. Effects of time of feeding on psychostimulant reward, conditioned place preference, metabolic hormone levels, and nucleus accumbens biochemical measures in food-restricted rats. *Psychopharmacology (Berl)* 227: 307-20
- Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. 2006. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 494: 528-48

## 8. Přílohy

### 8.1 Celkový seznam publikací autora

**Jerabek, P.**, Havlickova, T., Puskina, N., Charalambous, C., Lapka, M., Kacer, P., Sustkova-Fiserova, M. *Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced conditioned place preference and behavioral and accumbens dopaminergic sensitization in rats*. Neurochem Int, 2017. **110**: p. 101-113. DOI: 10.1016/j.neuint.2017.09.013. Průměr IF za 5 let: 3.407. IF: 3.603/2017. Citace k 4. 10. 2018: WOS – 2. Scopus – 2.

Sustkova-Fiserova, M., Charalambous, C., Havlickova, T., Lapka, M., **Jerabek, P.**, Puskina, N., Syslova, K. *Alterations in Rat Accumbens Endocannabinoid and GABA Content during Fentanyl Treatment: The Role of Ghrelin*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(11). DOI: 10.3390/ijms18112486. Průměr IF za 5 let: 3.878. IF: 3.687/2017. Citace k 4. 10. 2018: WOS – 0. Scopus – 0.

Sustkova-Fiserova, M., **Jerabek, P.**, Havlickova, T., Syslova, K., Kacer, P. *Ghrelin and endocannabinoids participation in morphine-induced effects in the rat nucleus accumbens*. Psychopharmacology (Berl), 2016. **233**(3): p. 469-84. DOI: 10.1007/s00213-015-4119-3. Průměr IF za 5 let: 3.342. IF: 3.222/2017. Citace k 4. 10. 2018: WOS – 6. Scopus – 6.

Ruda-Kucerova, J., Amchova, P., Havlickova, T., **Jerabek, P.**, Babinska, Z., Kacer, P., Syslova, K., Sulcova, A., Sustkova-Fiserova, M. *Reward related neurotransmitter changes in a model of depression: An in vivo microdialysis study*. World J Biol Psychiatry, 2015. **16**(7): p. 521-35. DOI: 10.3109/15622975.2015.1077991; Průměr IF za 5 let: 4.086. IF: 3.713/2017. Citace k 4. 10. 2018: WOS – 10. Scopus – 10.

Sustkova-Fiserova, M., **Jerabek, P.**, Havlickova, T., Kacer, P., Krsiak, M. *Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced accumbens dopamine release and behavioral stimulation in rats*. Psychopharmacology (Berl), 2014. **231**(14): p. 2899-



908. DOI: 10.1007/s00213-014-3466-9. Průměr IF za 5 let: 3.342. IF: 3.222/2017.

Citace k 4. 10. 2018: WOS – 16. Scopus – 17.

Andersson, M., Aronsson, P., Giglio, D., Wilhelmson, A., **Jerabek, P.**, Tobin, G. *Pharmacological modulation of the micturition pattern in normal and cyclophosphamide pre-treated conscious rats*. Auton Neurosci, 2011. **159** (1-2): p. 77-83. DOI: 10.1016/j.autneu.2010.08.008. Průměr IF za 5 let: 2.011. IF: 2.605/2017. Citace k 4. 10. 2018: WOS – 7. Scopus – 7.

## 8.2 Seznam příložených publikací

**Jerabek, P.**, Havlickova, T., Puskina, N., Charalambous, C., Lapka, M., Kacer, P., Sustkova-Fiserova, M. *Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced conditioned place preference and behavioral and accumbens dopaminergic sensitization in rats*. Neurochem Int, 2017. **110**: p. 101-113.

Sustkova-Fiserova, M., **Jerabek, P.**, Havlickova, T., Syslova, K., Kacer, P. *Ghrelin and endocannabinoids participation in morphine-induced effects in the rat nucleus accumbens*. Psychopharmacology (Berl), 2016. **233**(3): p. 469-84.

Sustkova-Fiserova, M., **Jerabek, P.**, Havlickova, T., Kacer, P., Krsiak, M. *Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced accumbens dopamine release and behavioral stimulation in rats*. Psychopharmacology (Berl), 2014. **231**(14): p. 2899-908.